

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TRIAGEM DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*
POR MEIO DE ENSAIO COLORIMÉTRICO SEMI-AUTOMATIZADO**

JADSON NASCIMENTO BORGES

**Salvador - Ba
2020**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**TRIAGEM DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*
POR MEIO DE ENSAIO COLORIMÉTRICO SEMI-AUTOMATIZADO**

JADSON NASCIMENTO BORGES

Orientadora: Dr^a. Milena Botelho Pereira Soares

Co-orientador: Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Salvador - Ba

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Borges, Jadson Nascimento.

B732t Triagem de compostos com potencial atividade anti-*Leishmania* por meio de ensaio colorimétrico semi-automatizado. / Jadson Nascimento Borges. - 2020.
68 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Milena Botelho Pereira Soares, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Leishmania. 2. Compostos sintéticos. 3. Triagem. I. Título.

CDU 616.993.161

TRIAGEM DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*
POR MEIO DE ENSAIO COLORIMÉTRICO SEMI-AUTOMATIZADO

JADSON NASCIMENTO BORGES

Folha de Aprovação

Salvador, 05 de novembro de 2020

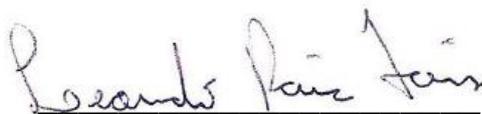
Comissão Examinadora



Dra. Valéria Pereira Hernandez
Pesquisadora
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES/FIOCRUZ



Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação – VPEIC/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para findar mais uma etapa de minha trajetória acadêmica e superar todos os obstáculos que enfrentei ao mudar de cidade para me aventurar neste curso.

À minha família por compreender todas as ausências ao longo destes anos, pelos incentivos e por inculcar em mim valores que sempre carregarei comigo.

À minha namorada, Paula Ladeia, por estar comigo em todos os momentos, durante este período, e por tentar sempre me acalmar nos momentos de desespero.

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares pela orientação durante nesses anos e pelo auxílio no andamento e delineamento da pesquisa.

Ao Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha pela coorientação e pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais.

À colega de mestrado Gabriela Bittencourt Grimaldi pela paciência em me ensinar as primeiras técnicas no início do curso e por me introduzir o cultivo de células.

Às meninas do time *Leish* Jessica, Dahara, Juliana e Tatiana por todo o conhecimento trocado, socorro prestado e descontração no dia-a-dia.

Ao pessoal do LETI que de alguma forma me auxiliou com a pesquisa.

Ao Dr. Diogo Moreira pelo auxílio no tratar dos compostos químicos.

Ao Dr. Maurício Santos e ao Dr. Alzir Azevedo Batista pelo fornecimento dos compostos utilizados neste trabalho.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia e ao Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz pelo fornecimento da infraestrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao pessoal do LAIPHE pelo empréstimo da estufa à 35° C.

À Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna pelo auxílio com a formação.

A todas as pessoas que, através do compartilhamento de seus conhecimentos, por meio das mídias sociais e da rede mundial de computadores, contribuíram, direta ou indiretamente, para que esse trabalho se concretizasse de modo mais inteligível.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao Projeto e a Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação (VPEIC/FIOCRUZ) pela concessão da bolsa.

A persistência é o caminho do êxito

Charles Chaplin

BORGES, Jadson Nascimento Borges. Triagem de compostos com potencial atividade anti-*Leishmania* por meio de ensaio colorimétrico semi-automatizado. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO As leishmanioses compreendem um conjunto de doenças infecciosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania* que atingem milhares de pessoas no mundo todos os anos. O tratamento convencional ainda é altamente tóxico, prolongado, financeiramente dispendioso e está associado à falha terapêutica, justificando a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos. **OBJETIVO.** No presente estudo foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* de 46 compostos químicos a partir da aplicação de um método de análise colorimétrico. **MÉTODOS.** A padronização do ensaio colorimétrico semi-automatizado para medir a viabilidade dos parasitos foi realizada utilizando macrófagos J774 e a cepa BA-125 de *L. amazonensis*, tratando ou não com anfotericina B, seguida de incubação a 25 °C em meio Schneider e a quantificação dos promastigotas com AlamarBlue® e leitura da absorbância a 570 e 600 nm. Em seguida, avaliamos a citotoxicidade de 46 compostos (26 hidrazonas, o lapachol livre, três complexos contendo rutênio e o precursor do complexo, a mefloquina e 5 complexos contendo 4-aminoquinolina, a lausona livre e um composto com rutênio, a alizarina livre e um composto com rutênio, um complexo contendo atovaquona, três compostos tiossemicarbazonas e o ligante livre), em células de mamífero não infectadas. O potencial leishmanicida dos compostos em estudo foi avaliado no ensaio colorimétrico padronizado. **RESULTADOS.** Não houve diferença estatística entre os valores de IC₅₀ encontrados pelo método da contagem manual de promastigotas e o ensaio de AlamarBlue® utilizando anfotericina ($p = 0,3429$). Dois compostos dos 26 testados da classe das hidrazonas (MM20 e MM24) apresentaram a atividade anti-*Leishmania* superior a 70% de inibição, com valores de CC₅₀ 112,3 e 120 µM, IC₅₀ 23,76 e 19,56 µM e IS 6,13 e 4,72, respectivamente. As tiossemicarbazonas foram os compostos menos tóxicos, porém com nenhum composto com atividade anti-*Leishmania* na maior concentração testada. Os complexos contendo 4-aminoquinolinas foram os mais citotóxicos (CC₅₀ de 12,7 a 18,2 µM), e três compostos (WV-65, WV-86, WV-74) tiveram maior atividade anti-*Leishmania* (IC₅₀ de 3,2 a 12 µM e IS de 1,72 a 8,34). **CONCLUSÃO.** O ensaio semiautomatizado pode ser útil para a triagem de compostos anti-*Leishmania*, e identificou quatro compostos mais promissores (WV-65, WV-86, WV-74 e MM20), pertencentes às 4-aminoquinolinas e hidrazonas.

Palavras-chave: *Leishmania*. Compostos sintéticos. Triagem farmacológica.

BORGES, Jadson Nascimento Borges. Screening of compounds with potential anti-*Leishmania* activity through semi-automated colorimetric assay. 2020. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Leishmaniasis comprises a group of infectious diseases caused by parasites of the *Leishmania* genus that affect thousands of people worldwide every year. Conventional treatment is still highly toxic, prolonged, financially expensive and is associated with therapeutic failure. Therefore, research and development of new drugs to treat leishmaniasis is justified. **OBJECTIVE.** In the present study, the anti-*Leishmania* activity of 46 chemical compounds was evaluated using a colorimetric assay method. **METHODS.** The standardization of the semi-automated colorimetric test to measure the viability of the parasites was performed using J774 macrophages and the BA-125 strain from *L. amazonensis*, treating or not with amphotericin B, followed by incubation at 25 °C in Schneider medium and the quantification of promastigotes with AlamarBlue® and absorbance reading at 570 and 600 nm. Then, we evaluated the cytotoxicity of 46 compounds (26 hydrazones, free lapachol, three complexes containing ruthenium and the complex precursor, mefloquine and 5 complexes containing 4-aminoquinoline, free lausone and a compound with ruthenium, free alizarin and a compound with ruthenium, a complex containing atovaquone, three thiosemicarbazone compounds and the free ligand) in uninfected mammalian cells. The leishmanicidal potential of the compounds under study was evaluated in the standardized colorimetric assay. **RESULTS.** There was no statistical difference between the IC₅₀ values found by the method of manual counting of promastigotes and the AlamarBlue® assay using amphotericin (p = 0,3429). Two compounds of the 26 hydrazones (MM20 and MM24) showed anti-*Leishmania* activity greater than 70% of inhibition, with CC₅₀ values of 112.3 and 120 µM, IC₅₀ 23.76 and 19.56 µM and IS 6.13 and 4.72, respectively. Thiosemicarbazones were the least toxic compounds, but with no compound with anti-*Leishmania* activity in the highest concentration tested. The complexes containing 4-aminoquinolines were the most cytotoxic (CC₅₀ from 12.7 to 18.2 µM), and three compounds (WV-65, WV-86 and WV-74) had the highest anti-*Leishmania* activity (IC₅₀ of 3.2 to 12 µM and IS from 1.72 to 8.34). **CONCLUSION.** The semiautomated assay can be useful for the screening of anti-*Leishmania* compounds, and identified four more promising compounds (WV-65, WV-86, WV-74 and MM20), belonging to 4-aminoquinolines and hydrazones.

Keywords: *Leishmania*. Synthetic compounds. Pharmacological screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2018.....	14
Figura 2. Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2018.....	15
Figura 3. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.....	20
Figura 4. Estruturas químicas dos compostos da classe das 4-aminoquinolinas utilizados como antimaláricos	26
Figura 5. Composto <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (SO ₃)(NO)](PF ₆). Um complexo com rutênio que possui atividade leishmanicida.	28
Figura 6. Forma protonada da hidrazona FCCP	31
Figura 7. Estrutura química do lapachol (2-Hidroxi-3-(3'-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) um dos principais compostos da classe naftoquinona	33
Figura 8. Estrutura geral de uma tiossemicarbazona sintética	36
Figura 9. Ensaio colorimétrico semi-automatizado para teste de atividade anti- <i>Leishmania</i>	45
Figura 10. Comparação entre os valores de IC ₅₀ da anfotericina B encontrados, com o método de contagem manual de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e a espectrofotometria através do ensaio de AlamarBlue®	48
Figura 11. Correlação de Spearman entre a contagem manual e de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> utilizando câmara de Neubauer e a espectrofotometria através do ensaio de AlamarBlue® de dois experimentos realizados em quadruplicata.....	49
Figura 12. Porcentagem de citotoxicidade de hidrazonas em células da linhagem J774.....	50
Figura 13. Porcentagem de atividade contra amastigotas de <i>Leishmania</i> de hidrazonas.....	51
Figura 14. Esquema referente aos próximos ensaios com os compostos mais promissores.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> do Novo Mundo, tipos de lesões causadas no homem e respectiva distribuição geográfica.....	13
Tabela 2. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses e seus respectivos esquemas terapêuticos, duração de tratamento, principais efeitos colaterais e forma clínica a qual é indicado.	20
Tabela 3. Estruturas dos compostos da classe das hidrazonas.....	40
Tabela 4. Estruturas dos complexos metálicos e moléculas livres.....	41
Tabela 5. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de compostos da classe das hidrazonas	50
Tabela 6. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de complexos metálicos contendo 4-aminoquinolina	52
Tabela 7. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de complexos metálicos contendo lausona	53
Tabela 8. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de complexos metálicos contendo lapachol	53
Tabela 9. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de complexos metálicos contendo alizarina	54
Tabela 10. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de complexo metálico contendo atovaquona.....	54
Tabela 11. Valores de citotoxicidade e atividade anti- <i>Leishmania</i> de compostos da classe das tiossemicarbazonas	55

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ATP	Do inglês: <i>Adenosine triphosphate</i>
BMDM	Do inglês: <i>Bone marrow-derived macrophages</i>
CC ₅₀	Concentração letal para 50% da população celular
CCL8	Do inglês: <i>C-C Motif Chemokine Ligand 8</i>
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CNN	Do inglês: <i>Cabo News Network</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DMSO	Dimetilsufóxido
ERV	<i>Enterococcus</i> resistente à varomicina
FCCP	Cianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazona
FDA	Do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO	Hidroxila
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% da população de parasitos amastigotas
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase
iRFP	Do inglês: <i>Infrared Fluorescent Protein</i>
IS	Índice de seletividade
LPG	Lipofosfoglicano
mg	Miligrama
MHC	Do inglês: <i>Major histocompatibility complex</i>

mL	Mililitro
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NS3	Do inglês: <i>Non-structural protein 3</i>
O ₂ ⁻	Ânion-radical superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Do inglês: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PDE-4	Fosfodiesterase-4
Penstrep	Penicilina e estreptomicina
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Do inglês: <i>Reactive oxygen species</i>
Ru	Rutênio
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
Sb ⁵⁺	Antimoniais pentavalentes
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SOD	Superóxido dismutase
TGF-β	Do inglês: <i>transforming growth factor β</i>
T _{H1}	Do inglês: <i>T helper 1</i>
T _{H2}	Do inglês: <i>T helper 2</i>
TLR	Do inglês: <i>Toll like receptor</i>
TNF-α	Do inglês: <i>Tumor necrosis factor-alfa</i>
TRTc	Tripanotiona redutase do <i>T. cruzi</i>
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	AS LEISHMANIOSES.....	11
2.2	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	16
2.3	DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	22
2.4	GRUPOS DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS TESTADOS.....	25
2.4.1	<i>As 4-aminoquinolinas</i>	25
2.4.2	<i>Complexos de coordenação</i>	27
2.4.3	<i>As hidrazonas</i>	30
2.4.4	<i>As naftoquinonas</i>	33
2.4.5	<i>As tiossemicarbazonas</i>	35
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	COMPOSTOS QUÍMICOS	39
4.2	PARASITOS	44
4.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	44
4.4	INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS J774 COM <i>L. AMAZONENSIS</i> ..	46
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS	48
5.1	PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA TESTE DE ATIVIDADE ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	48
5.2	TRIAGEM DE COMPOSTOS DA CLASSE DAS HIDRAZONAS.....	49
5.3	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI- <i>LEISHMANIA</i> DOS DEMAIS COMPOSTOS	51
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses compreendem uma série de enfermidades infecciosas que estão entre as mais negligenciadas do mundo. As leishmanioses têm como agentes etiológicos protozoários do gênero *Leishmania* e, como vetores, insetos dos gêneros *Phebotomus* e *Lutzomyia*. Este gênero de protozoários é composto por mais de 30 espécies, sendo que, ao menos 20 podem parasitar o ser humano (BUIRAGO et al., 2011; GRAÇA et al., 2012).

Atualmente, mais de 350 milhões de pessoas, em 98 países, estão sob o risco de infecção. A cada ano, são relatados cerca de 200 a 400 mil novos casos de leishmaniose visceral e 700 mil a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea, causando de 20.000 a 40.000 mortes (ALVAR et al., 2012). Mais de 94% das infecções ocorridas no ano de 2017 foram registradas no Brasil, na Etiópia, no Quênia, na Somália, no Sudão do Sul e no Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

O ciclo biológico da *Leishmania* é dito heteroxênico, pois são necessários dois hospedeiros para que se complete, um invertebrado (flebotomo) e outro vertebrado (mamífero). Durante o repasto sanguíneo, uma fêmea infectada inocula a forma promastigota metacíclica do parasito no hospedeiro vertebrado, essas formas flageladas são fagocitadas por macrófagos, ou outras células do sistema mononuclear fagocitário, e então são diferenciadas em amastigotas. O vetor se infecta com as amastigotas ao se alimentar do sangue do vertebrado infectado, fechando o ciclo biológico do parasito (MONTALVO et al., 2012).

As leishmanioses podem se manifestar em diferentes formas clínicas, entre elas a forma cutânea, a mucocutânea e a visceral. Tais formas têm maior ou menor probabilidade de ocorrência a depender do *background* genético do paciente, da cepa do parasito e do estado imunológico do hospedeiro. As manifestações clínicas podem incluir febre, anemia, enfraquecimento, hepatoesplenomegalia e supressão da imunidade (GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as estratégias para um controle efetivo das leishmanioses incluem: o controle de animais reservatórios, controle de vetores, gestão ambiental, aprimoramentos das condições sociais da população e dos fatores de riscos, diagnóstico precoce e tratamento correto dos pacientes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O tratamento convencional das leishmanioses é realizado quase que exclusivamente por medicamentos idealmente utilizados em outras doenças, ou seja, medicamentos reposicionados. Essa situação reside no fato das leishmanioses serem complexas doenças parasitárias passíveis de se manifestarem de variadas formas (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017; LAMOTTE et al., 2019). Além de se caracterizar como uma doença negligenciada e receber uma parcela muito pequena do investimento das pesquisas médicas no mundo, por afetar uma população majoritariamente de classe baixa (PINK et al., 2005), devido ao parasito apresentar diversas maneiras de subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro e lançar mão de estratégias para sobrepujar as terapias medicamentosas culminando no surgimento de cepas resistentes, uma estratégia que se apoie no desenvolvimento de uma vacina é pouco provável (FIELD et al., 2017).

O tratamento convencional da doença é altamente tóxico, prolongado, financeiramente dispendioso e está associado à falha terapêutica. Dessa forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos para tratar as leishmanioses são importantes (OLIVEIRA et al., 2011).

O presente estudo objetivou avaliar o potencial leishmanicida de novos compostos sintéticos, com o intuito de identificar compostos candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos mais seguros e eficazes do que os fármacos atualmente utilizados na terapêutica da enfermidade, fazendo uso de um método que possua validade biológica ao procurar mimetizar o ciclo natural do parasito. Para tal, padronizamos e aplicamos um ensaio colorimétrico semi-automatizado para a triagem dos compostos em formas amastigotas de *L. amazonensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS LEISHMANIOSES

Leishmania é um gênero de protozoários parasitos obrigatórios pertencentes a família Trypanosomatidae, que infectam diversos animais domésticos e silvestres, além de seres humanos. Inicialmente, observado por Borovosky em 1898 e, independentemente, descrito por Leishman e Donovan em 1903 (REY, 2008), este parasito é o agente etiológico responsável pelas leishmanioses. Esta doença é de cunho vetorial e zoonótico, que possui variadas formas de manifestações no ser humano. O gênero *Leishmania* é composto por cerca de 30 espécies, das quais aproximadamente 20 são patogênicas para humanos (DESJEUX, 2004). O parasito é transmitido por meio da picada de insetos hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (BUITRAGO et al., 2011).

As Leishmanias são parasitos heteroxênicos por possuir dois hospedeiros, um intermediário e um definitivo. No hospedeiro definitivo, um mamífero, as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) são infectadas por formas flageladas denominadas promastigotas metacíclicas, inoculadas durante o repasto sanguíneo do vetor (hospedeiro intermediário). Após a infecção, as formas promastigotas internalizam o flagelo e se transformam em amastigotas (MONTALVO et al., 2012).

As formas promastigotas metacíclicas são caracterizadas pela alta motilidade, por possuírem um corpo celular pequeno, um flagelo longo, chegando até duas vezes o tamanho do corpo, e não apresentarem fixação em tecidos do hospedeiro invertebrado (KILLICK-KENDRICK, 1990). Estas formas flageladas se ligam às células do SMF por meio de interações mediadas por receptores e são contidas em um fagossomo, o qual se funde a um lisossomo formando o fagolisossomo ou, neste caso, vacúolo parasitóforo.

O vacúolo parasitóforo possui o interior ácido, rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas, entretanto, o parasito subverte os mecanismos de defesa da célula hospedeira e mantém-se vivo. Entre as estratégias de sobrevivência do protozoário no interior da célula hospedeira podemos citar: retardo da maturação do endossomo e sua fusão com o fagossomo, que estão relacionados a acumulação de F-actina dependente de lipofosfoglicano (LPG); Neutralização dos intermediários

reativos de oxigênio pelo LPG; Inibição da produção de NO (óxido nítrico), possivelmente pela produção de interleucina-10 (IL-10); Interferência na apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), diminuição na expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) e na ativação de células NK, devido ao aumento na secreção do fator de transformação- β (TGF- β), inibe a sinalização de JAK2/STAT1, etc. (ANTOINE et al., 1998; HANDMAN; BULLEN, 2002; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005)

A forma amastigota é de grande importância médica pois é a responsável pelas manifestações clínicas da infecção, assim como pela manutenção da infecção e pelas recidivas tardias. As amastigotas, portanto, constituem o alvo das drogas leishmanicidas. As formas amastigotas são consideravelmente menores que as formas promastigotas. São formas replicativas, que se multiplicam no vacúolo parasitóforo dentro da célula hospedeira, e normalmente saem da célula hospedeira e infectam outras, como, por exemplo, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e até mesmo fibroblastos (MCCONVILLE et al., 2007).

Sobre a liberação dos amastigotas internalizados por macrófagos, o mais aceito é que o macrófago infectado se rompe, liberando amastigotas nos arredores da célula já morta, porém imagens geradas por microscopia sugerem que os amastigotas são liberados contidos em vacúolos em um processo semelhante à exocitose (HANDMAN; BULLEN, 2002).

As espécies de *Leishmania* mais comuns no Brasil são: *L. (Leishmania) infantum* (NICOLLE; COMTE, 1908), *L. (Viannia) braziliensis* (VIANNA, 1911), *L. (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1970), e *L. (Viannia) guyanensis* (FLOCH, 1954; BACHA et al., 2011). Os sinais clínicos da leishmaniose humana podem se dar nas seguintes formas (Tabela 1): (1) cutânea, forma mais comum, já foi relatada em todos os estados do país; (2) cutaneomucosa ou mucocutânea, que pode acarretar leões deformadoras na região facial; (3) cutânea difusa, forma encontrada em pacientes anérgicos ou tardiamente em indivíduos que foram tratados para leishmaniose visceral e (4) visceral, que é a manifestação mais grave da doença, também conhecida como calazar (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, tipos de lesões causadas no homem e respectiva distribuição geográfica.

Espécie	Tipo de lesão	Distribuição geográfica
<i>L. (V.) braziliensis</i>	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul até o norte da Argentina
<i>L. (V.) peruviana</i>	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta ocidental dos Andes
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Predominantemente cutâneas	Países do noroeste e norte da América do Sul, até o rio Amazonas
<i>L. (V.) panamensis</i>	Predominantemente cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Casos raros, com lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>L. (V.) shawi</i>	Casos raros, com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) naiffi</i>	Casos raros, com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (L.) mexicana</i>	Cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	México e América Central
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	América Central e Norte, Nordeste e Sul do Brasil
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Cutâneas e, eventualmente, cutâneo-difusas	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutâneas	Venezuela
<i>L. (L.) infantum</i>	Lesões viscerais	Do sul do México ao norte da Argentina, com predominância no Nordeste Brasileiro

Adaptado de Rey, 2008.

Mais de 70% dos casos de leishmaniose cutânea no mundo ocorrem em apenas 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (Figura 1 e Figura 2) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Algumas características da doença são: placas, pápulas e nódulos com espessamento da pele em múltiplos locais. A lesão pode variar em diâmetro de milímetros a centímetros e podem ser observadas, no mesmo indivíduo lesões em locais distintos (MACHADO et al., 2015). Há uma tendência de que as leishmanioses cutâneas do Velho Mundo curem-se espontaneamente enquanto que para a cura das formas do Novo Mundo é comumente necessária intervir com tratamento sistêmico (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

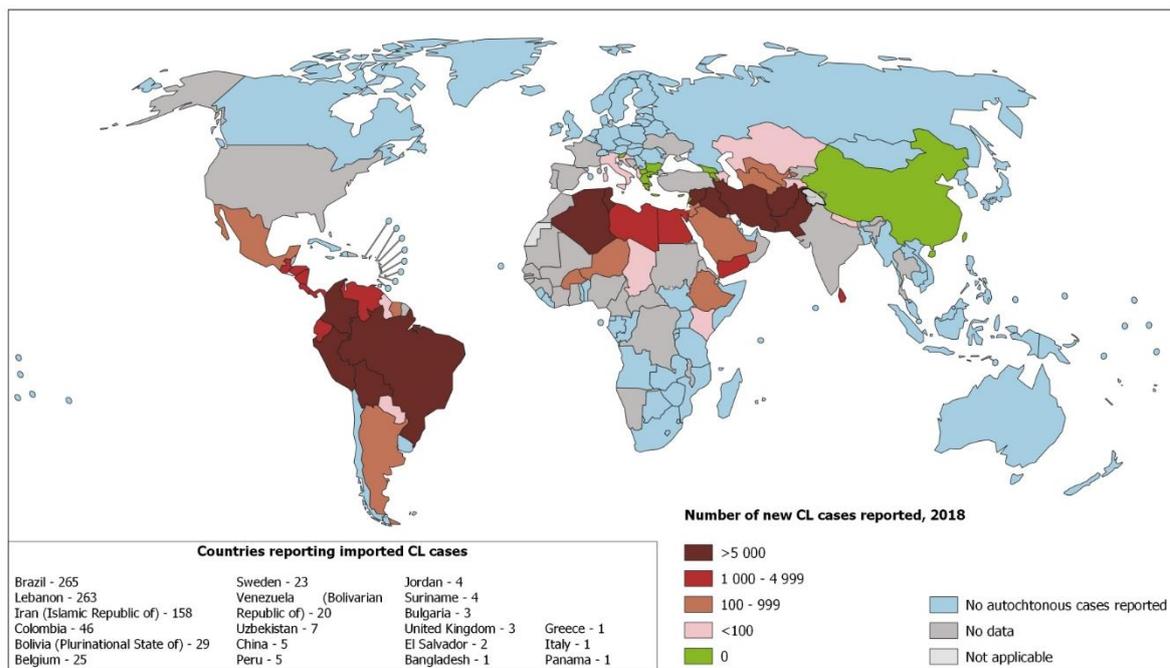


Figura 1. Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2018. Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2019

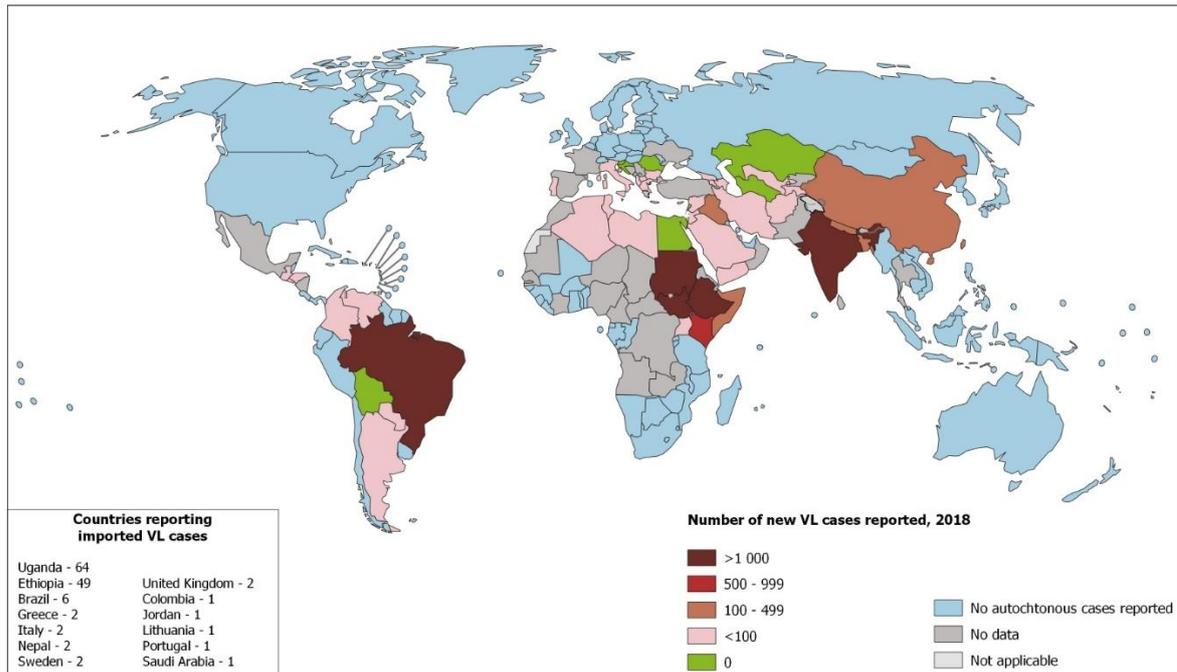


Figura 2. Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2018. Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2019.

A forma cutânea da leishmaniose é a mais comum, compreende cerca de 90% dos casos do Brasil. Das notificações, de 3 a 6% evoluem para a forma mucocutânea, entretanto, em algumas regiões onde é endêmica, a predominância pode ser maior que 25%. Esta forma clínica é causada principalmente pela *Leishmania (V.) braziliensis*. Já a forma difusa é mais rara e seu agente etiológico é a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* (VASCONCELOS et al., 2018). Ambas as espécies apresentam os mesmos sinais clínicos, porém variados prognósticos. As lesões causadas por parasitos do subgênero *Vianna* tendem a ser mais agressivas e é mais provável de reincidir após o tratamento. Já as lesões provocadas pelo subgênero *Leishmania* tendem a ser mais brandas e ter boa cura após o tratamento (VOLPINI et al., 2004). Cerca de 10% dos pacientes infectados por *L. braziliensis*, após tratados, apresentam persistência da infecção, progredindo, em alguns casos, para a forma mucocutânea da doença e, em alguns casos, evoluem para a forma mucocutânea da enfermidade. Esses fenômeno pode ser explicado pela multiplicação de uma população de protozoários resistentes ao fármaco utilizado e disseminação hematogênica seria a provável responsável da disseminação das lesões para outras partes do corpo (PASSOS et al., 2000).

A leishmaniose visceral possui caráter crônico e é potencialmente fatal para os

humanos. Sua taxa de mortalidade pode atingir 10% quando a mesma não é tratada adequadamente. O parasito pode se manter por anos no organismo do hospedeiro, se espalhando pelos sistemas sanguíneo e linfático. Essa é a explicação mais plausível para a ocorrência de formas metastáticas, com lesões em mucosas e lesões cutâneas recorrentes (BELO et al., 2014).

De acordo com a OMS, o número de pessoas infectadas no mundo excede 12 milhões. Mais de 90% dos incidentes da doença ocorrem em países que carecem substancialmente dos recursos requeridos para um bom diagnóstico e controle efetivo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Segundo o Ministério da Saúde, em 2015, foram registrados 20.187 casos de leishmaniose tegumentar e 3.770 casos de leishmaniose visceral no Brasil e 2.431 casos de leishmaniose tegumentar e 315 casos de leishmaniose visceral no estado da Bahia (BRASIL, 2017).

Características da expansão das populações humanas, tais como a urbanização e a destruição das florestas, a ocorrência dos conflitos armados e o aumento do turismo causam a migração da população suscetível a áreas endêmicas e proporcionam a dispersão da *Leishmania* (ALVAR et al., 2012). Várias espécies de mamíferos podem servir de reservatório para a doença. Os cães são considerados os principais reservatórios para a leishmaniose visceral em áreas urbanas, o que tem se tornado um sério problema de saúde pública no Brasil (ASHFORD, 2000).

Segundo a OMS, medidas como o controle de animais que atuem como reservatórios, manejo ambiental, combate aos vetores, mitigação dos fatores de risco e melhoramento das condições sociais da população, além de um diagnóstico precoce e assertivo aliado a um tratamento eficiente dos pacientes são medidas indispensáveis para o controle das leishmanioses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

2.2 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

As enfermidades causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania* constituem-se como a única doença infecciosa causada por tripanossomatídeos, cujo tratamento convencional é majoritariamente realizado por drogas reposicionadas, ou seja, quimioterapias tradicionalmente empregadas em outras patologias (LAMOTTE et al., 2019). A dificuldade no desenvolvimento de um tratamento eficaz contra as

leishmanioses reside no fato desta doença infecciosa complexa manifestar-se em diferentes formas clínicas (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Dentre as limitações dos tratamentos atualmente oferecidos para a leishmaniose, podemos elencar a alta toxicidade, falha terapêutica, surgimento de cepas resistentes, custos elevados e baixa adesão ao tratamento (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017; LAMOTTE et al., 2019). Os fármacos de primeira escolha para tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), nos quais incluem-se o stibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metil glucamina, compostos com alta toxicidade, podendo provocar distúrbios de repolarização cardíaca, trazendo assim a necessidade da realização de eletrocardiograma e ausculta cardíaca no paciente. No Brasil, o N-metil glucamina, comercialmente chamado de Glucantime® (Figura 3), é a única formulação disponível (BRASIL, 2017). Os principais efeitos adversos relatados com o uso de antimoniais pentavalentes são: dor na musculatura esquelética, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, anorexia, astenia, fadiga, febre, exantema, eritema e urticária (OLIVEIRA et al., 2011). Em relação ao seu mecanismo de ação, o tratamento com o Glucantime® foi relatado como um possível ativador de endonucleases específicas que promovem a fragmentação do DNA amastigotas, acarretando sua morte (SERENO et al., 2001). A redutase dependente de tiol 1 (RDT1) da *Leishmania*, cuja maior expressão se dá na forma amastigota, é responsável pela redução do Sb^{5+} em Sb^{3+} , um análogo mais tóxico (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004).

Dentre as drogas de segunda escolha, podemos ressaltar a anfotericina B, um antifúngico que, por sua elevada toxicidade e necessidade de administração intravenosa, requer hospitalização do paciente. Dentre os efeitos colaterais do uso de anfotericina B para o tratamento da leishmaniose estão: febre, calafrio, nefrotoxicidade, hipocalcemia, miocardite e até mesmo o óbito (GHORBANI; FARHOUDI, 2017). No Brasil está disponível para o tratamento da leishmaniose, por meio do Ministério da Saúde, o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (BRASIL, 2017). A anfotericina atua na membrana celular do protozoário através da formação de complexos com o ergosterol, levando à formação de poros na membrana (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005).

A anfotericina B lipossomal consiste na droga anfotericina B complexada a um lipossomo unilamelar constituído por lecitina de soja hidrogenada, fosfocolina, colesterol e sacarose, com α -tocoferol e hidrato de succinato dissódico (LEMKE;

KIDERLEN; KAYSER, 2005). Este fármaco é administrado por via intravenosa. Febre e tremores ou calafrios são os efeitos adversos mais comuns do uso desta droga e é contraindicada apenas a pacientes com insuficiência renal ou hipersensibilidade a anfotericina B ou a algum componente da fórmula (BRASIL, 2017). A anfotericina lipossomal pode ser administrada em dosagens até cinco vezes superiores em relação à anfotericina convencional, porém esta droga possui como limitação o custo elevado (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

A miltefosina se apresenta como um fármaco de terceira escolha para o tratamento da leishmaniose. Inicialmente utilizada para tratamento de lesões de pele causadas pelo câncer de mama (PACHIONI et al., 2013), foi, em 2002, aprovada como o primeiro fármaco para tratamento da leishmaniose através da administração por via oral (GHORBANI; FARHOUDI, 2017). A resistência ao tratamento com esta droga pode ser observado em parasitos que apresentam mutação no transportador da miltefosina e conseqüentemente possuem uma má internalização da droga (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2015). Entre os efeitos adversos observados durante o tratamento com miltefosina, podemos citar: vômitos, náusea, cinetose, dor de cabeça e diarreia (OLIVEIRA et al., 2011). A miltefosina é capaz de causar a morte de amastigotas intracelulares por promover a condensação e fragmentação do DNA, culminando em um processo semelhante à apoptose de metazoários (VERMA; DEY, 2004).

A pentamidina é uma droga que pode ser utilizada no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas, porém, além de existirem diversas ressalvas ao uso, como a contraindicação em pacientes com desregulação da glicemia, cardiopatas, nefropatas, hepatopatas, hipertensão, hipotensão, hiperglicemia, hipoglicemia, hipocalcemia, leucopenia, trombocitopenia, dentre outros, devido aos seus potenciais efeitos adversos, tais como dor musculoesquelética e abdominal, anorexia, fadiga, abscessos estéreis, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (OLIVEIRA et al., 2011; BRASIL, 2017). A pentamidina influencia no complexo mitocôndria-cinetoplasto do parasito, possivelmente impedindo a replicação do seu DNA (HENTZER; KOBAYASI, 1977; CROFT; BRAZIL, 1982).

Um vasodilatador periférico chamado pentoxifilina teve seu efeito como coadjuvante no tratamento da leishmaniose comprovado com algum sucesso em pesquisas, resultando em menor tempo de tratamento devido ao seu efeito

imunomodulador, entretanto não é indicado seu uso isolado, e sim em combinação com o Glucantime®. Além dos estudos sobre o uso da pentoxifilina no tratamento da leishmaniose serem escassos, o uso deste fármaco pode apresentar efeitos adversos, principalmente de ordem gastrointestinal, como sensação de pressão gástrica, plenitude, náusea, vômito e diarreia (BRASIL, 2017). A pentoxifilina reduz a secreção da citocina TNF- α em macrófagos, atuando, assim, como imunomoduladora durante a infecção (OLIVEIRA et al., 2000).

A paromomicina é um antibiótico que possui baixa toxicidade em células de mamíferos e é umas das drogas atualmente utilizada no tratamento das leishmanioses (FERNÁNDEZ; MALCHIODI; ALGRANATI, 2011). O uso da paromomicina com o stibogluconato de sódio foi implementado pela OMS após um estudo em países no Leste da África (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Alguns dos efeitos adversos relatados no tratamento da leishmaniose com a paromomicina são: vômito, diarreia, ototoxicidade, zumbido transitório, perda de audição, miocardite reversível e nefrotoxicidade (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009). Em relação a ação que este antibiótico causa no parasito foram relatados efeitos na síntese de macromoléculas levando a interrupção do crescimento, modificações dos lipídios polares da membrana e da fluidez da membrana, culminando na alteração da permeabilidade da mesma (MAAROUF et al., 1997).

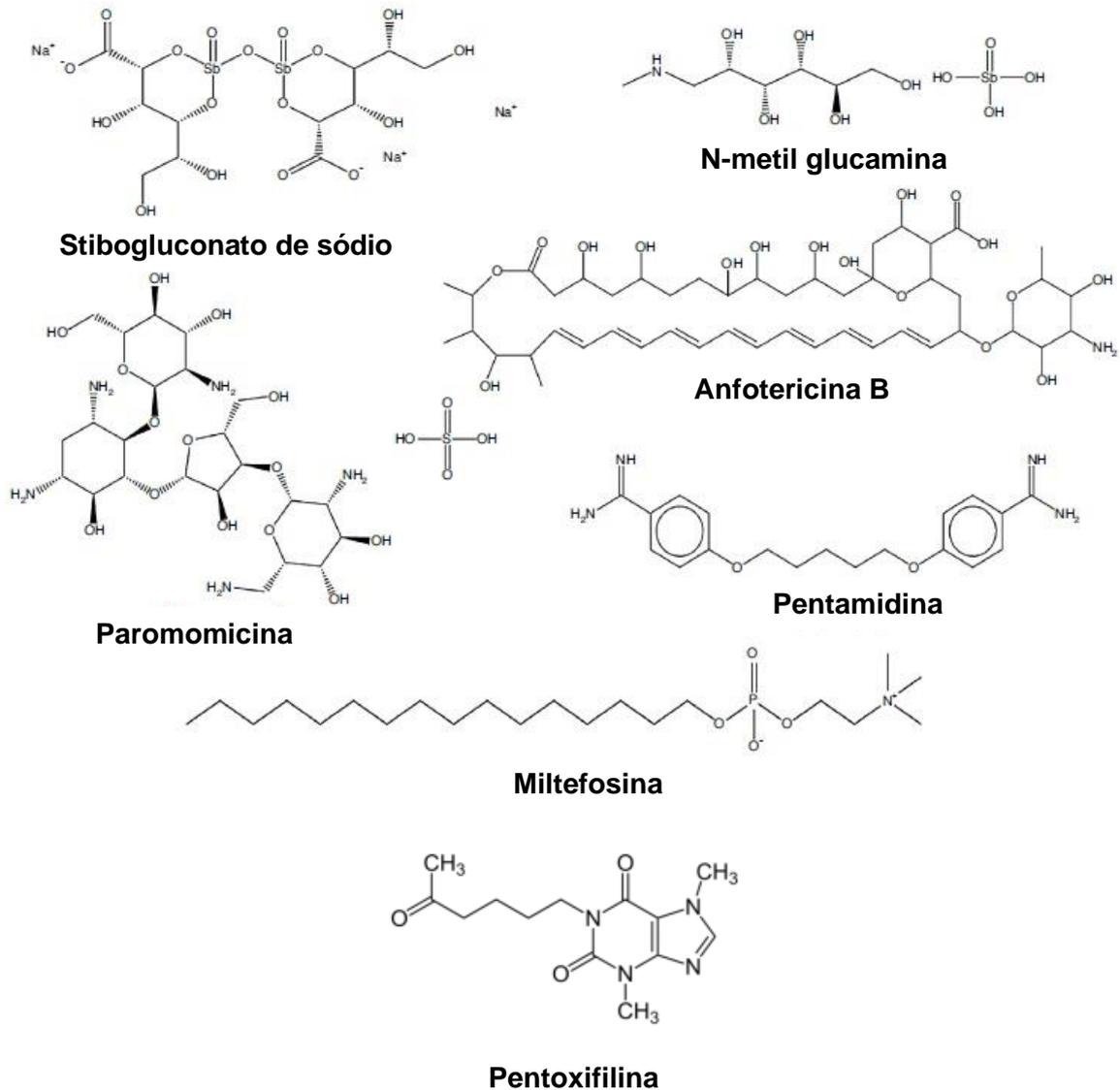


Figura 3. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. Adaptado de Zulfiqar; Shelper; Avery, 2017; Donate-Correa et al., 2019.

Tabela 2. Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses e seus respectivos esquemas terapêuticos, duração de tratamento, principais efeitos colaterais e forma clínica a qual é indicado.

Fármaco	Esquema terapêutico	Duração	Efeitos colaterais	Manifestação clínica a qual é indicado
Stibogluconato de sódio	20 mg/Kg/dia	30 dias	Grave cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade	Visceral e cutânea
N-metil glucamina	10 a 20 mg/Kg/dia	20-30 dias	Dor na musculatura esquelética, náusea, vômito,	Visceral e cutânea

			diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, anorexia, astenia, fadiga, febre, exantema, eritema e urticária	
Anfotericina B	0,7 a 1,0 mg/Kg/dia, com dose total de 25 a 40 mg/kg	42- 43 dias consecutivos ou alternados	Febre, calafrio, nefrotoxicidade, hipocalemia, miocardite e óbito	Visceral e cutânea
Anfotericina B Lipossomal	2 a 5 mg/Kg/dia (sem limite de dose máxima diária)	9 dias consecutivos	Febre e tremores ou calafrios	Visceral
Paromomicina	15 mg/Kg/dia	21 dias	Vômito, diarreia, ototoxicidade, zumbido transitório, perda de audição, miocardite reversível, nefrotoxicidade	Visceral e cutânea
Pentamidina	3 a 4 mg/Kg/dia, em dias alternados	Por pelo menos 4 meses ou até que a lesão não seja visível	Dor musculoesquelética e abdominal, anorexia, fadiga, abscessos estéreis, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia	Visceral e cutânea
Miltefosina	2 a 2,5 mg/Kg/dia	28 dias	Vômitos, náusea, cinetose, dor de cabeça e diarreia	Visceral
Pentoxifilina	Um comprimido de 400 mg, três vezes ao dia	30 dias	Sensação de pressão gástrica, plenitude, náusea, vômito e diarreia	Uso combinado com o Glucantime

Adaptado de Brasil (2017); Zulfiqar, Shelper e Avery (2017)

O tratamento habitual empregados nas leishmanioses é prolongado, financeiramente dispendioso, está associado à falha terapêutica e é altamente tóxico,

podendo inclusive levar ao óbito. Portanto, a busca por novos compostos que possam mitigar essas limitações e aumentar a efetividade do tratamento, diminuir os efeitos adversos e contraindicações, além de aumentar a adesão do paciente torna-se de elevada importância.

2.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Apesar dos avanços na elucidação de compostos leishmanicidas, o desenvolvimento de um novo fármaco que não seja apenas eficiente contra o parasito e inócuo ao hospedeiro, mas também possua baixo custo e uma maior adesão do paciente ao tratamento, ainda é esperado.

Embora a combinação de fármacos como, por exemplo, stibogluconato de sódio e paromomicina, tenham bons resultados (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017), os efeitos adversos associados ao seu uso, do surgimento de cepas resistentes, como já descrito para miltefosina e anfotericina, e do custo destes tratamentos justifica o investimento no desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Por ser uma doença negligenciada, dada a população pobre e marginalizada a qual majoritariamente afeta, as leishmanioses, juntamente com a doença de Chagas, malária e tuberculose, receberam um investimento global de apenas 0,1% nas pesquisas da área de saúde no ano 2000, embora a infecção global estimada seja de 5% (PINK et al., 2005). Dada a plasticidade fenotípica apresentada pela *Leishmania*, o parasito pode apresentar resistência mesmo a terapias utilizando combinações entre fármacos (PONTE-SUCRE et al., 2017).

Apesar das falhas terapêuticas e dos efeitos adversos ocasionados pelos tratamentos atualmente disponíveis, uma abordagem vacinal para o controle da leishmaniose é de considerável dificuldade dada a elevada eficiência que este protozoário possui em evadir-se do sistema imunológico humano (FIELD et al., 2017). Sabendo disso, a elucidação de uma droga que estabeleça uma melhor terapia para a doença, seja por diminuir o tempo de tratamento, reduzir os custos, diminuir os efeitos adversos ou diminuir o surgimento de cepas resistentes, permanece a principal linha de trabalho no esforço de mitigar a endemicidade dessa infecção (FIELD et al., 2017).

Tradicionalmente, as pesquisas de triagem de drogas para doenças infecciosas são conduzidas utilizando duas principais abordagens: triagem com base no alvo (triagem de proteínas, por exemplo) e triagens fenotípicas (triagem de células inteiras).

Geralmente, as pesquisas de desenvolvimento de novos fármacos para as leishmanioses são realizadas utilizando ensaios de triagem fenotípica. Nesta modalidade de ensaio não há um alvo pré-definido uma molécula ou via de sinalização, mas sim o organismo como um todo. A maioria das novas moléculas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1998 e 2008 partiram de ensaios fenotípicos, com 28 novos compostos sendo elucidados pela triagem fenotípica e 17 pela triagem baseada num alvo (SWINNEY; ANTHONY, 2011; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Uma vantagem desta abordagem é que ela torna possível um escalonamento de triagem permitindo a testagem de grandes bibliotecas de compostos (GILBERT, 2013).

A triagem baseada em um alvo, por sua vez, tem como ponto de partida uma proteína que faça parte de determinada via de sinalização, por exemplo, e drogas selecionadas pela sua capacidade de especificamente atuar sobre aquele determinado alvo serão testadas (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Para tal, faz-se necessário inicialmente um levantamento de compostos que atuem contra o alvo em questão e em seguida uma triagem para selecionar os melhores candidatos, após essa triagem é necessário que se otimize este candidato para que o seu efeito no alvo escolhido seja potencializado. Um fator limitante é que, geralmente, existem poucos alvos validados, particularmente em doenças infectoparasitárias, e o mesmo só é tido como validado quando há um medicamento no mercado no qual comprovadamente seu modo de ação é direcionado a aquele alvo (GILBERT, 2013).

Em trabalhos que utilizam a triagem farmacológica contra *Leishmania*, a cepa do parasito e a linhagem e tipo de célula hospedeira utilizadas são elementos de suma importância para que se tenha um ensaio de alta reprodutibilidade e validação biológica e clínica. A triagem realizada pela empresa *GlaxoSmithKline* (GSK), por exemplo, não sustentou seus resultados quando submetidos a reprodução utilizando uma cepa infectiva de *Leishmania* e uma linhagem mais genuína de macrófagos (LAMOTTE et al., 2019). Dessa forma, a falta de uma metodologia padronizada que produza resultados com validade biológica e clínica torna-se um obstáculo no desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas.

Os sais de tetrazólio são reduzidos, por deidrogenases e redutases, em formazan, que são corantes que possuem diferentes cores a depender do sal de tetrazólio do qual foi reduzido. Estes sais são utilizados para acessar a viabilidade celular e possuem aplicabilidade no descobrimento de novas drogas. Alguns exemplos de sais de tetrazólio são: O brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio (MTT) é insolúvel em meio de cultura e requer a lise celular para aferição da citotoxicidade, além de ser mais indicado para células -aderentes (RAMPERSAD, 2012); O 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) é mais sensível, mais rápido e o formazan formado é solúvel em meio de cultura, além de ser indicado tanto para células aderentes quanto para não-aderentes. Entretanto, o XTT necessita de metossulfato de fenazina para ser reduzido com mais eficiência (RAMPERSAD, 2012); O ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS), um sal de tetrazólio hidrossolúvel, funciona de acordo com o princípio de que a desidrogenase da mitocôndria reduz o sal em formazano, que é colorido, e pode ser lido em um comprimento de onda de 492 nm. O método de MTS tem sido largamente utilizado como uma alternativa ao MTT, por eliminar a etapa de solubilização que tornaria o ensaio de MTT mais propenso a erros (GOODWIN et al., 1995; O'TOOLE et al., 2003).

Os sais de tetrazólio geralmente são citotóxicos pois os cristais de formazan produzidos após sua redução precisam ser solubilizados em DMSO ou ácido clorídrico/isopropanol, substâncias essas de alto poder de destruição para as células (RAMPERSAD, 2012).

O método de alamarBlue[®], é um método que pode utilizar a colorimetria ou a fluorescência e é baseado na redução da resazurina (não fluorescente) que é reduzida em resorufina (fluorescente), alterando a coloração (de azul para rosa), pelo metabolismo celular. É um método barato, simples, atóxico para as células e o manipulador, possui alta sensibilidade, é hidrossolúvel, permeável pela membrana celular, é um composto estável, indicado tanto para células aderentes quanto para não-aderentes, requer apenas equipamentos básicos, não sofre interferência de aditivos do meio de cultivo, etc. Ao contrário do MTT, por exemplo, a resazurina será reduzida não apenas pelo FMNH₂, FADHs, NADH e NADPH, mas também pelos citocromos, sendo assim, a cadeia respiratória não será desligada como ocorre quando o MTT é utilizado (BUENO et al., 2002).

Dificuldades na identificação e validação do alvo, na escolha de modelo mais apropriado, o uso de modelos complexos, falta de padronização de metodologia, dificuldades de parcerias entre indústria e universidades/centros de pesquisa, falta de apoio financeiro, dificuldade de integração entre entidades multidisciplinares, ausência de políticas governamentais, burocracias no registro de patente e custos elevados, são outros empecilhos encontrados no desenvolvimento de uma nova terapia contra as leishmanioses (ALCÂNTARA et al., 2018).

Dado o exposto, pesquisas que propõem a descoberta de novas drogas que possam ser implementadas em terapias contra as leishmanioses são de extrema valia no combate desta doença infecciosa.

2.4 GRUPOS DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS TESTADOS

2.4.1 *As 4-aminoquinolinas*

A classe das 4-aminoquinolinas consiste em uma forma das aminoquinolinas cuja posição 4 da quinolina possui adicionalmente um grupo amino (BRAY; HAWLEY; WARD, 1996). As 4-aminoquinolinas geralmente são compostos que apresentam baixa toxicidade, são bem toleradas, são boas candidatas para tratamento da infecção aguda da malária, por exemplo, são fáceis de sintetizar e possuem baixo custo (O'NEILL et al., 1998). Fazem parte desta classe a cloroquina, a hidroxicloroquina (um derivado menos tóxico da cloroquina), a primaquina e a amodiaquina, tidos como compostos de notável atuação no enfrentamento da malária (BOSAK et al., 2019) (Figura 4). A cloroquina e a hidroxicloroquina são as únicas drogas aprovadas pela FDA que inibem a autofagia (MAUTHE et al., 2018).

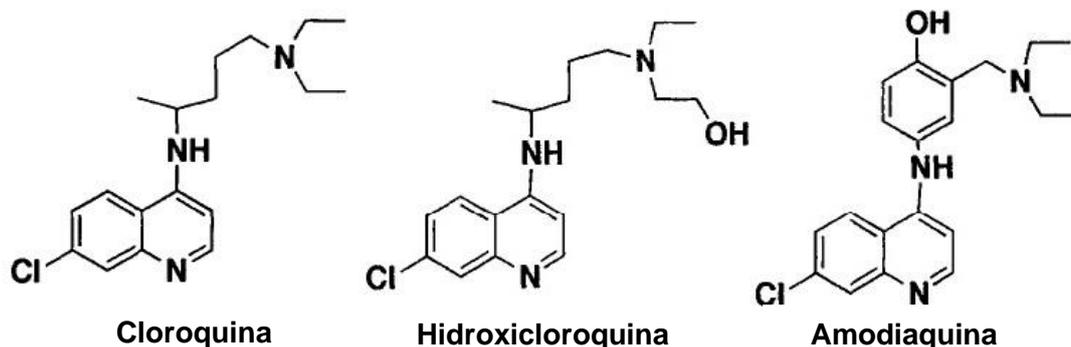


Figura 4. Estruturas químicas dos compostos da classe das 4-aminoquinolinas utilizados como antimaláricos. Adaptado de O'NEILL et al. (1998).

Estudos vêm mostrando que compostos que derivam de uma estrutura de quinolina são fortes inibidores de colinesterases, acetilcolinesterases e butirilcolinesterases (XIE et al., 2013; HAMULAKOVA et al., 2018). Os compostos antimaláricos cloroquina e hidroxicloroquina, que possuem estrutura derivada de 4-aminoquinolina, possuem comprovada atividade anticolinesterase (LIM; GO, 1985; DAWSON, 2005; KATEWA; KATYARE, 2005).

A cloroquina (7-cloro-4-(4-dietil-amino-1-metilbutilamino)-quinolina), um dos compostos sintéticos mais importantes da história da farmacologia (O'NEILL et al., 1998), é um medicamento de baixo custo, com efeito modulador do sistema imunológico, tradicionalmente utilizado como um composto antimalárico (CORTEGIANI et al., 2020) e posteriormente contra doenças inflamatórias (AL-BARI, 2015). Esta droga interfere na última fase da autofagia, por impedir a fusão dos autofagossomos com os lisossomos (MAUTHE et al., 2018). É bastante eficaz em matar a forma eritrocítica das espécies de *Plasmodium* spp., o esquizonte, envolvida na degradação da hemoglobina (O'NEILL et al., 1998).

A hidroxicloroquina (se diferencia da cloroquina pela adição de um grupo hidroxila no final da cadeia lateral) possui variados efeitos imunomodulatórios como, por exemplo, inibir a sinalização do receptor *toll-like* (TLR), culminando numa limitação da ativação das células B e das células dendríticas, diminuir a produção do TNF- α , IL-6 e IFN- γ , assim como a cloroquina, etc. Tais mecanismo podem explicar a eficácia do medicamento no tratamento de artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e possivelmente outras doenças inflamatórias (KYBURZ; BRENTANO; GAY, 2006; KALIA; DUTZ, 2007).

Na década de 1960, quando, por conta da tentativa de erradicar a malária utilizando inseticidas para eliminar o mosquito e cloroquina para tratar os pacientes, houve uma forte pressão seletiva causando resistência a cloroquina por parte dos parasitos, houve a necessidade do uso de novas drogas para o tratamento desta enfermidade (PETERS, 1987). A amodiaquina apresentou-se como uma forte aliada no tratamento dos parasitos resistentes a cloroquina (O'NEILL et al., 1998). Amodiaquina, assim como a cloroquina, também atua inibindo a digestão de produtos da hemoglobina e possui um efeito esquizonticida, para todas as espécies de *Plasmodium*, e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*, discretamente superior ao da cloroquina (BRASIL, 2001). A amodiaquina também é um inibidor não-competitivo mais potente que a cloroquina para as acetilcolinesterases e butirilcolinesterases (LIM; GO, 1985).

O uso de moléculas com estruturas derivadas das 4-aminoquinolinas como agentes leishmanicida vem sendo relatado em diversos estudos.

A cloroquina e a hidroxicloroquina demonstraram atividade significativa contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Esse efeito pode residir na danificação da via endocítica, evidenciado pela acumulação de estruturas multivesiculares e modificações no complexo de Golgi. Além disso, animais tratados oralmente com cloroquina tiveram carga parasitária reduzida nos linfonodos auriculares (ROCHA et al., 2013). Um composto do grupo das 4-aminoquinolinas eficaz contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e não tóxico para macrófagos murinos foi avaliado, indicando que este age através do aumento de produção de ROS na membrana mitocondrial do protozoário, causando a sua permeabilização e a disfunção dessa organela (ANTINARELLI et al., 2016). Um composto derivado das 4-aminoquinolinas demonstrou atividade *in vivo* contra *L. infantum* sem mostrar sinais de toxicidade para o animal. O composto indicou induzir alteração no metabolismo energético do parasito por meio de uma despolarização da membrana mitocondrial, influenciando na síntese de ATP, além da liberação de ATP em adição a uma produção elevada de ROS (KONSTANTINOVIC et al., 2018; MANZANO et al., 2019).

2.4.2 Complexos de coordenação

Um complexo de coordenação é constituído por um átomo de um metal de transição quimicamente cercado por moléculas inorgânicas ou orgânicas, que são denominadas ligantes. O rutênio e a platina são exemplos de metais que são usualmente complexados com moléculas, objetivando um aumento dos efeitos farmacológicos das mesmas, tais como a cisplatina e a carboplatina (CLAVEL et al., 2015; FARRELL, 2015).

Destaca-se, entre os metais de transição mais empregados para este fim, que o rutênio (Ru) é o mais adequado para o desenvolvimento de compostos com potencial farmacológico. Algumas características fazem do rutênio um bom candidato para o desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade biológica, tais como: podem adquirir três distintos estados de oxidação em fluídos biológicos (II, III e, provavelmente, IV) (Figura 5); os compostos de Ru podem trocar nitrogênio e doar oxigênio e são potenciais formadores de complexos octaédricos; podem ocupar inúmeras posições espaciais; e, possivelmente, podem transportar um alto número de moléculas acessórias (BERGAMO et al., 2012; FRIK et al., 2014; CLAVEL et al., 2015).

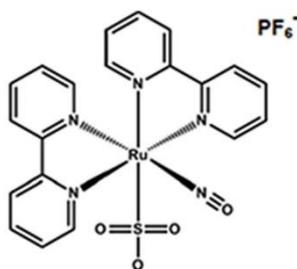


Figura 5. Composto *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)](PF₆). Um complexo com rutênio que possui atividade leishmanicida (NASCIMENTO et al., 2019).

Devido à possibilidade de utilizar transferrina para se acumular em tumores, por uma similaridade com o ferro (FRIK et al., 2014), os derivados de Ru vêm sendo estudados como compostos promissores para serem utilizados na área oncológica (BERGAMO; SAVA, 2011; MAZURYK et al., 2012). Podem representar uma alternativa ao uso de compostos contendo platina (Pt), que possuem vários efeitos adversos, como, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, neuropatia, mielossupressão, trombocitopenia e neutropenia, além de gerar células malignas resistentes (CLAVEL et al., 2015; IIDA et al., 2016). Várias moléculas orgânicas vêm sendo ligadas ao Ru

no intuito de formarem complexos com uma menor citotoxicidade (D'SOUSA et al., 2017).

Complexos de cloroquina contendo platina (II) são compostos hidrossolúveis e exibem, *in vitro*, uma atividade antimalárica similar ao da cloroquina, inclusive ao serem testados contra cepas resistentes à cloroquina do *P. falciparum*, sem exibir citotoxicidade significativa para a célula hospedeira, possivelmente combinando os efeitos da cloroquina com novos mecanismos relacionados ao metal (MACEDO et al., 2017). Os compostos cisplatina e carboplatina citados acima, são utilizados na área oncológica, no tratamento de carcinoma de ovário com uma taxa de 50-65% em pacientes não-tratados anteriormente. A carboplatina é um análogo da cisplatina, tão ativa quanto esta última, porém menos tóxica (GORE et al., 1989).

Compostos contendo metais de transição vêm sendo estudados também para avaliação de seu potencial antiparasitário. Exemplo disso são estudos que testam o efeito da cloroquina quando complexada com esses elementos (GLANS et al., 2012; DUBAR et al., 2013; SALAS et al., 2013; EKENGARD et al., 2015). Estudos sugerem que a estrutura química da molécula, que é concedida pela adição do metal, é de maior importância até do que a função que este exerce de entregar a droga, indício deste dado é o fato de que compostos contendo duas cloroquinas na estrutura não possuem maior efeito do que aqueles contendo apenas uma (RAJAPAKSE et al., 2009; NAVARRO et al., 2011, 2014).

Foi observado, por Otero et al. (2006), que a maioria dos complexos de paládio (Pd) utilizados em seu estudo possuíam atividade tripanocida significativamente superior do que os ligantes sozinhos, com valores de IC₅₀ menores do que o Nifurtimox, a droga de referência. Os efeitos tripanocida dos complexos foram devidos à inibição da atividade da enzima tripanonucleotidil transferase do *T. cruzi* (TRTc). Compostos coordenados com paládio e tiossemicarbazonas exibiram forte efeito contra linhagens de células de câncer de mama, sejam elas sensíveis ou resistentes a drogas, e concomitantemente não tóxicas para as células saudáveis, sendo a indução de apoptose o principal efeito apontado para a morte das células malignas (PADHYE et al., 2005).

O complexo contendo Ru (II) tetramina nitrosil (*trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄imN](BF₄)₃) exibiu um efeito anti-*L. major* por mitigar a proliferação parasitária em camundongos BALB/c infectados em 98% com um tratamento de 500 nmol kg⁻¹ day⁻¹ e exibiu uma eficiência de 66 vezes maior que o Glucantime® (MELO PEREIRA et al., 2010).

Complexos de Ru-clotrimazol foram testados *in vitro* para avaliação de seus efeitos anti-tripanosomatídeos, os autores puderam observar um aumento dos efeitos leishmanicidas da forma complexada em relação a forma livre do clotrimazol, um antifúngico. Em amastigotas intracelulares de *L. major*, dois compostos apresentaram efeitos inibitórios em baixas concentrações (MARTÍNEZ et al., 2012). Em um ensaio *in vivo* de infecção com *L. major*, complexos Ru-clotrimazol mostraram-se eficientes em induzir a morte celular dos parasitos por provocar a externalização de fosfolípidios, a despolarização da membrana interna mitocondrial e a fragmentação do DNA (INIGUEZ et al., 2016). O complexo nitrosil de Ru foi testado *in vitro* e *in vivo* contra a infecção por *L. braziliensis*. No ensaio *in vitro*, mesmo na concentração mais baixa (1 μ M) o complexo demonstrou considerável atividade leishmanicida após 24 h. No modelo murino, esse composto foi eficiente em reduzir o tamanho da lesão na pata e a carga parasitária no linfonodo drenante em 99,9% (NASCIMENTO et al., 2019).

Pelo exposto, evidencia-se o potencial biológico que possuem os complexos de coordenação, inclusive em mitigar a infecção protozoária causada por parasitos do gênero *Leishmania*.

2.4.3 As hidrazonas

As hidrazonas compreendem uma classe de moléculas, caracterizadas pela estrutura $R_2C=NNH_2$, bastante utilizadas como ponto de partida para a sínteses de novos compostos com atividades biológicas (NIČ et al., 2009; ALAM; LEE, 2015). Dentre os efeitos biológicos que são atribuídos a esta classe química podemos citar: efeito anticancerígeno (ZHENG et al., 2009), antibiótico (RASRAS et al., 2010; VUKOVIC et al., 2010), antituberculose (RAMAMOCHAN et al., 1995), anticonvulsante (JAIN; SRIVASTAVA; SINHA, 2007), antioxidante (FAREED et al., 2013), diurético (MISHRA et al., 1995; SUPURAN et al., 1996) e analgésico (SILVA et al., 2015).

Diversos trabalhos vêm indicando o potencial das moléculas pertencentes a esta classe e seus mecanismos de ação enquanto compostos imunomoduladores, anti-inflamatórios, antiparasitários, dentre outros.

Um exemplo de hidrazona com importante função biológica é o cianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP), um ionóforo, ou seja, uma molécula capaz de transportar íons através da membrana lipídica das células. O FCCP, que funciona

como um desacoplador hidrofóbico, interrompe a síntese de ATP por transportar íons de hidrogênio pela membrana da mitocôndria antes que possam ser utilizados pela fosforilação oxidativa (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013; PUBCHEM, 2020) (Figura 6).

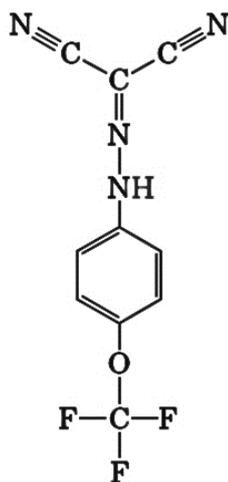


Figura 6. Forma protonada da hidrazona FCCP. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

Inam e colaboradores (2014) demonstraram a atividade antimalárica do composto 3-[4-(7-Cloro-4-quinolil)piperazina-1-il]-N-[(E)-2-hidroxifenil]metilenoamino]propanamida, uma N-acilhidrazona, por inibir o crescimento e o ciclo biológico (impedindo diferenciação em esquizonte) do *P. falciparum*, além de inibir a formação de β -hematina e não demonstrar atividade hemolítica em eritrócitos não infectados. Um composto, 4-(Nitrofenil)hidrazona, demonstrou uma atividade anti-inflamatória e imunomodulatória por intervir na secreção de IL-1 β (Interleucina-1 beta), inibindo a secreção de óxido nítrico, culminando na redução da expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e na síntese de PGE₂ em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, além de inibir a proliferação linfocitária e a produção de citocinas (MEIRA et al., 2018). (E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-metoxibenzohidrazida, um derivado das N-acilhidrazonas que funciona como inibidor da fosfodiesterase-4 (PDE-4), demonstrou um forte efeito imunomodulatório em macrófagos RAW 264.7 por meio da inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que é um importante fator de transcrição para citocinas pró-inflamatórias. Esses resultados apontam para o potencial uso deste composto no tratamento de doenças inflamatórias (GUIMARÃES et al., 2018). Um

estudo descreveu o teste de 10 novas moléculas derivadas das indol-N-acilhidrazonas em relação ao seu potencial efeito anti-inflamatório. Um desses compostos se destacou por inibir a proliferação de linfócitos em 62,7%, induzir aumento na produção de citocinas T_H2, inibir seletivamente a COX-2, possuir bom desempenho em diminuir edema induzido por carragenina em modelo murino, inibindo em 100% 5 h após estímulo (MORAES et al., 2018). A molécula (N'-[(1E)-3-(4-nitrofenilhidrazono)]-(2E)-propan-2-ilideno-3,5-dinitrobenzohidrazida), um composto derivado das N-acilhidrazonas, foi testado em um modelo de inflamação alérgica das vias aéreas (camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina). O tratamento oral com o composto reduziu a produção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13) no lavado broncoalveolar e a expressão de interleucina-4 (IL-4), IL-10 e do gene CCL8 nos pulmões, indicando a atividade anti-inflamatória da molécula (CERQUEIRA et al., 2019).

A atividade parasiticida, especialmente em relação a protozoários do gênero *Leishmania*, de compostos desta classe vêm sendo demonstrada por diversos trabalhos nos últimos anos.

Em um ensaio de infecção com *L. donovani* expressando *DsRed* em macrófagos J774A.1, foi demonstrado o efeito leishmanicida de compostos derivados das hidrazonas. O composto mais efetivo (IC₅₀ = 14 µM) seguiu para um ensaio *in vivo*. Este composto foi capaz de reduzir a infecção esplênica de hamsters em 73% por meio da ação do NO e de ROS, culminando em ação apoptótica no parasito (JAISWAL et al., 2016). Um composto, derivado da estrutura das hidrazonas, destacou-se por exibir significativa atividade leishmanicida em amastigotas (IC₅₀ = 0,59 µM) sem causar danos significativos ao macrófago infectado. Os autores sugerem que o mecanismo de ação responsável pela morte do parasito foi o estresse oxidativo e que a porção nitroheterocíclica da molécula influencie positivamente na ação anti-*L. braziliensis* do composto (ROMERO et al., 2017). Um estudo demonstrou que a derivatização de tiocroman-4-onos com acil-hidrazonas aumenta a atividade leishmanicida da molécula. Dois dos compostos testados mostraram grande atividade anti-*L. panamensis* (IC₅₀ < 10 µM) e baixa toxicidade para a célula hospedeira (VARGAS et al., 2017). Compostos derivados das hidrazonas foram testados contra amastigotas de *L. amazonensis*-GFP infectando macrófagos murinos. Dois compostos exibiram melhores resultados (IC₅₀ = 4,07 e 10,8 µM) e os autores concluíram que ambos causam despolarização da membrana interna mitocondrial e elevam os níveis

de ROS, além de possuem boa biodisponibilidade oral (COIMBRA et al., 2019). Uma série de 17 compostos derivado das hidrazonas foram submetidos a um ensaio contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Catorze compostos mostraram ação leishmanicida ($IC_{50} = 21,785$ a $58,23 \mu M$), sendo que nenhum deles exibiu toxicidade nos macrófagos murinos utilizados no ensaio (DA SILVA et al., 2020).

Como descrito acima, diversos efeitos biológicos podem ser atribuídos a compostos pertencentes à classe das hidrazonas. Esses compostos podem ser empregados em uma série de doenças, incluído as causadas por parasitos.

2.4.4 As naftoquinonas

Os compostos classificados como naftoquinonas compreendem um grupo da família das quinolonas, grande família de metabólitos naturais que possuem um anel naftalênico sustentando o anel quinonóidico. Como exemplos podemos citar as vitaminas do tipo K, de grande importância para nosso organismo, e o lapachol (Figura 7), encontrado em diversas famílias botânicas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). As 1,2- e 1,4-naftoquinonas são também compostos tóxicos que derivam do metabolismo do naftaleno, que é principal hidrocarboneto polinuclear aromático presente no ar ambiental (KUMAGAI et al., 2012).

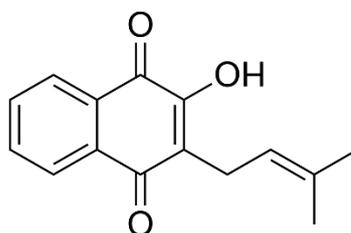


Figura 7. Estrutura química do lapachol (2-Hidroxi-3-(3'-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) um dos principais compostos da classe naftoquinona (PINTO; DE CASTRO, 2009).

O lapachol já foi comercializado para uso no tratamento de certos tipos de câncer, como um coadjuvante. O que torna esse composto interessante é a sua característica de provocar o estresse oxidativo por meio da formação intracelular de ROS, por exemplo, o ânion-radical superóxido (O_2^-) que pode ser convertido em

peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela superóxido dismutase (SOD) seguido pela criação do radical hidroxila (HO) através da redução do peróxido catalisada pelo ferro, ou seja, são pró-oxidantes (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; PINTO; DE CASTRO, 2009). As naftoquinonas também podem atuar formando ligações covalentes com nucleófilos de tecidos, ou seja, sendo eletrófilas. Além disso, esses compostos podem atuar sobre vias de sinalização que culminam em respostas pró- e anti-inflamatórias e lesões celulares, por exemplo, inibindo a ativação do NF-κB (KUMAGAI et al., 2012; SOARES et al., 2017).

Nos últimos anos, essa classe de compostos vem sendo relatada como tendo diversas atividades biológicas promissoras, tais como ação anti-inflamatória e antinociceptiva, reduzindo o edema induzido pela carragenina, produção de PGE₂ e aminas simpáticas (SOARES et al., 2017); anticâncer, induzindo apoptose e parada do ciclo celular de células tumorais e inibição da topoisomerase-II (KUMAR et al., 2017); antimalárico, atuando em cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina, e inibindo a enzima PfDHODH (BRANDÃO et al., 2018); microbicida, prevenindo a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* em modelo *ex vivo* de pele de porco e modelo *in vivo* de *Drosophilla melanogaster* infectadas (NAIR et al., 2016); tripanocida, induzindo autofagia, estresse oxidativo e eliminando tripomastigotas de *T. cruzi* em concentrações de IC₅₀ inferiores à do benzonidazol (LARA et al., 2018).

Outro bom exemplo do grande potencial desta classe é a atovaquona, que é um composto conhecido por ser utilizado no tratamento adulto ou pediátrico da malária, juntamente com o proguanil em um único comprimido oral (CDC, 2018). A atovaquona age nas mitocôndrias do parasito, impedindo o transporte de elétrons e colapsando a diferença de potencial elétrico da membrana interna desta organela, enquanto o proguanil, impede a ação da enzima di-hidrofolato redutase, e, por conseguinte, impedindo a síntese de DNA e a divisão celular (SHANKS et al., 1998). A própria atovaquona já foi testada como droga leishmanicida, por meio do tratamento oral de camundongos BALB/c, infectados com *L. donovani*, durante 7 dias, sugerindo que este medicamento possa ser utilizado como um aliado no tratamento da leishmaniose quando combinado ao tratamento convencional (MURRAY; HARIPRASHAD, 1996).

Outras naftoquinonas também já foram testadas contra parasitos do gênero *Leishmania*. O lapachol foi submetido a testes *in vitro* e *in vivo* (em hamster) contra a

espécie *Leishmania braziliensis*. No teste *in vitro*, o composto apresentou atividade leishmanicida, porém no ensaio em hamsters o composto não preveniu o desenvolvimento de lesões em um esquema terapêutico de 300 mg/kg/dia durante 42 dias (TEIXEIRA et al., 2001). Uma série de compostos naftoquinônicos foram testados contra amastigotas de *L. major*-GFP infectando macrófagos derivados de medula óssea (BMDM). Além de demonstrar um bom efeito leishmanicida dos compostos testados, os autores também inferem que esta capacidade está fortemente relacionada à natureza dos grupos presentes nesses compostos, e que a presença de grupos HO na quinona torna esse efeito menos pronunciado (ALI et al., 2011). A capacidade do composto epoxi- α -lapachona de reduzir a infecção de macrófagos humanos derivados de PBMC *in vitro* causada por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi demonstrada (SOUZA-SILVA et al., 2014). Hamsters infectados com *L. braziliensis* foram tratados com a pterocarpanquinona LQB-118 no sétimo dia de infecção, este tratamento perdurou por 8 semanas. O tratamento, tanto oral quanto intralesional, foi efetivo em controlar o tamanho da lesão e a carga parasitária. Os autores concluem que a ação leishmanicida está relacionado com mecanismos apoptóticos do composto (COSTA et al., 2014). Compostos derivados da 2-N,N'-dialquilamino-1,4-naftoquinona foram submetidos a um ensaio *in vitro* de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss Webster com *L. chagasi*, no qual 8 compostos demonstraram atividade contra amastigotas, sendo que 5 deles não demonstraram toxicidade contra a célula hospedeira (DE ARAÚJO et al., 2017). Compostos desta classe foram submetidos a ensaios *in vitro* e *ex vivo* (célula HepG2 e explantes esplênicos murinos, respectivamente) contra a cepa transgênica iRFP-*Leishmania infantum*. O estudo indicou que, apesar de alguns compostos se comportarem como bons leishmanicida, existe um mecanismo de ação desconhecido que seja complementar a ação de inibidor da DNA-topoisomerase-IB de *Leishmania* (PÉREZ-PERTEJO et al., 2019).

Tais trabalhos, alguns entre muitos, evidenciam o potencial que a classe das naftoquinonas possui para o desenvolvimento de compostos que possam atuar no tratamento de enfermidades diversas, inclusive parasitárias, como as leishmanioses.

2.4.5 As tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas são compostos geralmente obtidos pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas. Possuem aquisição

versátil, baixo custo, gastam poucos átomos e possuem uma gama de aplicações (TENÓRIO et al., 2005) (Figura 8). Tais compostos apresentam variadas funções biológicas importantes, por exemplo: antitumoral (LISIC et al., 2018), antibacteriana (ZHANG et al., 2015), antiviral (PADMANABHAN et al., 2017), antiprotozoária (LINCIANO et al., 2018), antifúngica (DE ARAÚJO NETO et al., 2020), dentre outras.

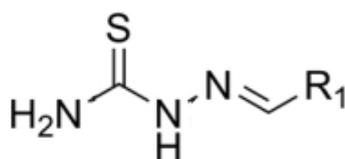


Figura 8. Estrutura geral de uma tiossemicarbazona sintética (BRAGA et al., 2016).

Como exemplo da atividade que esses compostos exercem sobre microorganismos podemos citar: inibição da enzima topoisomerase-II α humana em células cancerígenas (LISIC et al., 2018); inibição de bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) (ZHANG et al., 2015); redução da infecção pelos quatro sorotipos do vírus da Dengue em células Vero, de maneira concentração-dependente, provavelmente interferindo na proteína não-estrutural 3 (NS3) (PADMANABHAN et al., 2017); ação oxidativa contra *C. albicans*, provavelmente causando depleção de glutathiona reduzida (GSH), levando ao acúmulo de ROS, provocando lesões mitocondriais, despolarização da membrana e morte por apoptose (DE ARAÚJO NETO et al., 2020).

Em relação ao potencial antiparasitário desta classe, podemos elencar vários exemplos: possui potencial inibitório contra *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. infantum* (LINCIANO et al., 2018), sendo já demonstrada a habilidade de inibir *in vitro* o crescimento de formas epimastigotas do *T. cruzi*, com atividade comparável a droga de referência utilizada na clínica, o Nifurtimox, possivelmente por meio de ação redox (PÉREZ-REBOLLEDO et al., 2008). De forma mais específica, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, na intenção de validar esta classe como promissora no desenvolvimento de compostos que possam ser úteis no combate aos parasitos causadores das leishmanioses. Uma tiossemicarbazona derivada do limoneno

demonstrou efeito leishmanicida alterando a forma e a ultraestrutura do parasita, causando despolarização da membrana mitocondrial e aumentando a peroxidação lipídica das células de *L. amazonensis* (BRITTA et al., 2012). Uma outra tiossemicarbazona derivada do S-limoneno inibiu amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* que infetavam macrófagos J774A1. A molécula provocou desorganização da membrana mitocondrial interna, alta vacuolização e presença de corpos lipídicos no citoplasma (BRITTA et al., 2014). Em um ensaio *in vitro* onde a *L. amazonensis* foi submetida a um tratamento combinado com uma tiossemicarbazona juntamente com a miltefosina causou danos celulares e mitocondriais ao parasito, devido à geração de ROS e espécies reativas de nitrogênio, promovendo a autofagia e, conseqüente, a apoptose. Entretanto, não houve efeito citotóxico significativo para a célula hospedeira (SCARIOT et al., 2017). Derivados de tiossemicarbazona apresentaram baixa toxicidade em macrófagos peritoneais murinos e induziram ação anti-*L. amazonensis* possivelmente através da modulação de TNF- α , IL-10, IL-12 e NO (DA SILVA et al., 2017). Um ensaio *in vitro* demonstrou que dois compostos da classe das tiossemicarbazonas neutralizaram a infecção por *L. amazonensis* com uma eficiência de seis a oitos vezes superior ao da miltefosina, tendo um efeito citotóxico inferior para as células hospedeiras, além de serem seguros em camundongos por via oral e parental. Os autores sugerem que os compostos agem por um mecanismo antifolato (TEMRAZ et al., 2018).

Pelo exposto acima, podemos dizer que a classe das tiossemicarbazonas constituem-se como portadoras de grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças parasitárias, incluindo as leishmanioses.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de compostos sintéticos utilizando um ensaio colorimétrico semi-automatizado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o método colorimétrico semi-automatizado para a triagem de compostos anti-*Leishmania*;
- Determinar a citotoxicidade dos compostos em cultura de células de mamíferos;
- Determinar *in vitro* a atividade anti-*L. amazonensis* de 46 compostos sobre formas amastigotas;
- Calcular o índice de seletividade dos compostos sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*.

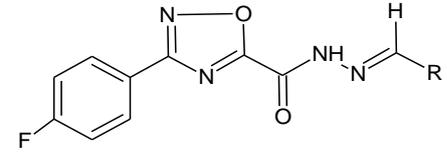
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

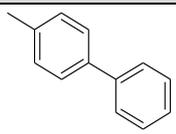
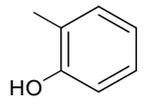
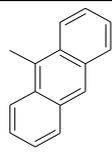
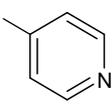
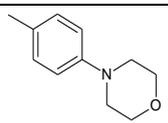
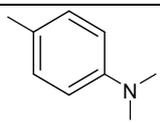
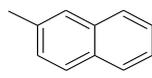
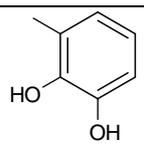
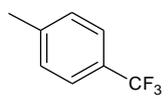
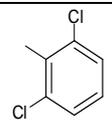
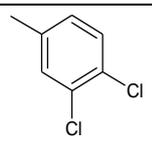
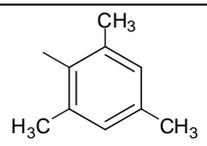
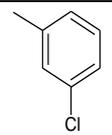
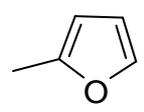
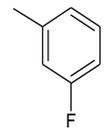
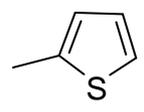
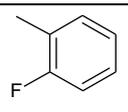
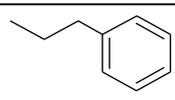
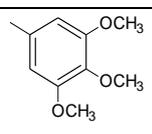
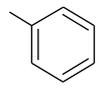
Foram testados 46 compostos de classes diferentes: 26 hidrazonas, o composto lapachol livre, três complexos metálicos contendo rutênio e o precursor do complexo metálico, a mefloquina, um complexo metálico contendo 4-aminoquinolina não-substituída e quatro complexos metálicos contendo mefloquina, sendo dois com paládio e três com platina, o composto lausona livre e um composto na forma complexada com rutênio, o composto alizarina livre e um composto na forma complexada com rutênio, um complexo metálico contendo atovaquona e três compostos tiosemicarbazonas e o seu ligante livre. Os compostos sintéticos inéditos com a estrutura de hidrazonas do 4-fluoro-1,2,4-oxadiazol-5-il-hidrazida (Tabela 3) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Maurício Santos, da Universidade Federal de Pernambuco. Os complexos metálicos foram fornecidos pelo Dr. Alzir Azevedo Batista, da Universidade Federal de São Carlos (Tabela 4).

Os compostos foram pesados em balança analítica e, em seguida, diluídos em DMSO, de acordo com sua massa molecular, para a concentração estoque de 10 mM. Todos os compostos foram armazenados em freezer a -20 °C até o momento de sua utilização. A anfotericina B (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA) foi utilizada como controle positivo nos ensaios de infecção *in vitro* na concentração de 2 µM, enquanto que a menadiona na concentração de 50 µM serviu de controle positivo para os testes de citotoxicidade.

Tabela 3. Estruturas dos compostos da classe das hidrazonas.



Hidrazonas do 4-fluoro-1,2,4-oxadiazol-5-il-hidrazida

Código	R	Código	R
MM1		MM20	
MM2		MM21	
MM3		MM22	
MM6		MM24	
MM8		MM26	
MM9		MM27	
MM10		MM29	
MM11		MM30	
MM12		MM33	
MM15		MM34	

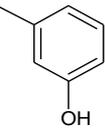
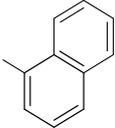
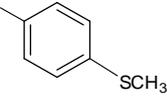
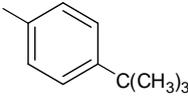
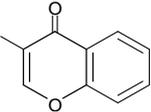
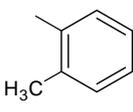
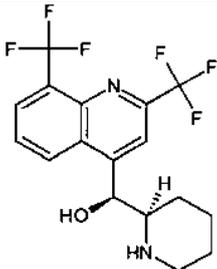
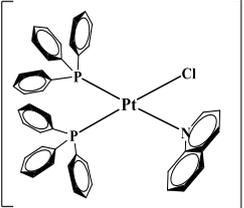
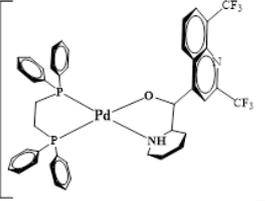
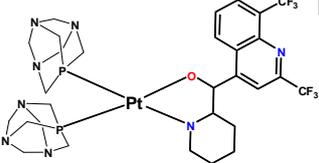
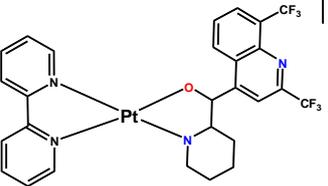
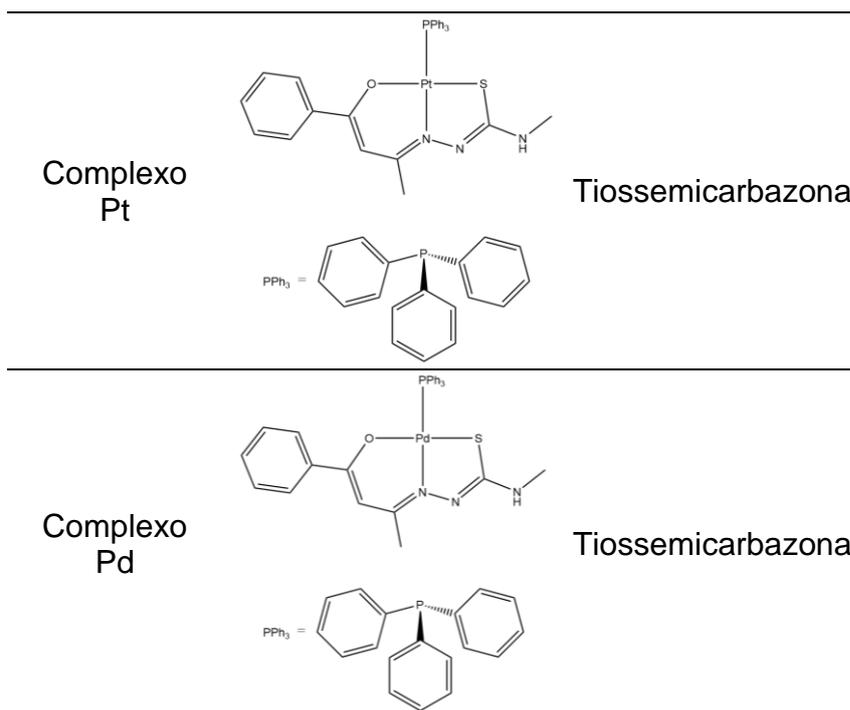
MM17		MM35	
MM18		MM36	
MM19		MM38	

Tabela 4. Estruturas dos complexos metálicos e moléculas livres

COMPOSTO	ESTRUTURA	CLASSE
Mefloquina		4-aminoquinolina
WV_q-92		Complexo metálico contendo 4-aminoquinolina não-substituída
WV-60		Complexo metálico contendo 4-aminoquinolina Mefloquina
WV-65		Complexo metálico contendo 4-aminoquinolina Mefloquina
WV-86		Complexo metálico contendo 4-aminoquinolina Mefloquina

WV-74		Complexo metálico contendo 4-aminoquinolina Mefloquina
AQLAW		Complexo metálico contendo a naftoquinona Lausona
AQLAPM		Complexo metálico contendo a naftoquinona Lapachol
AQLIZ		Complexo metálico contendo a naftoquinona Alizarina
AQLAP		Complexo metálico contendo a naftoquinona Lapachol
AQUA		Precursor do complexo metálico contendo a naftoquinona Lapachol
RuCl(ATO)		Complexo metálico contendo a naftoquinona Atovaquona

RuCl(LAP)		Complexo metálico contendo uma naftoquinona derivada do Lapachol
ALIZ		Naftoquinona Alizarina
LAW		Naftoquinona Lausona
LAP		Naftoquinona Lapachol
Ligante		Tiossemicarbazona
Complexo Ni		Tiossemicarbazona



4.2 PARASITOS

Amastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125) foram obtidas periodicamente do linfonodo popliteal de camundongos C57BL/6 (PEREIRA; ALVES, 2008) e utilizadas para o cultivo de promastigotas em meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (pen/strep; Gibco). Os parasitos foram cultivados a 26° C por 3 a 5 dias e contados diariamente utilizando câmara de NeuBauer e lamínula de vidro sob microscópio óptico invertido até que fosse atingida a fase estacionária de crescimento, para então ser realizada a etapa de infecção *in vitro*.

4.3 PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA TESTE DE ATIVIDADE ANTI-*Leishmania*

Realizamos a padronização de um método semi-automatizado para avaliação de atividade anti-*Leishmania* (Figura 9). Para isso, infectamos macrófagos da linhagem J774, cultivados em placas de 96 poços, com promastigotas de *L. amazonensis* em estágio estacionário de crescimento, em uma proporção de 10:1, durante 24 h à temperatura de 35° C em 5% de CO₂. Os macrófagos infectados foram

então tratados com anfotericina B, na concentração de 2 μM , durante 72 h. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram recuperadas após a lise dos macrófagos com SDS 0,02% e cultivo em meio Schneider 20% SBF foram quantificadas através de dois métodos: leitura colorimétrica em poços incubados com AlamarBlue® ou contagem manual das utilizando câmara de Neubauer. Os valores de poços não tratados foram então comparados com dados obtidos em poços tratados com a anfotericina B, droga de referência, nas concentrações de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 e 0.06 μM .

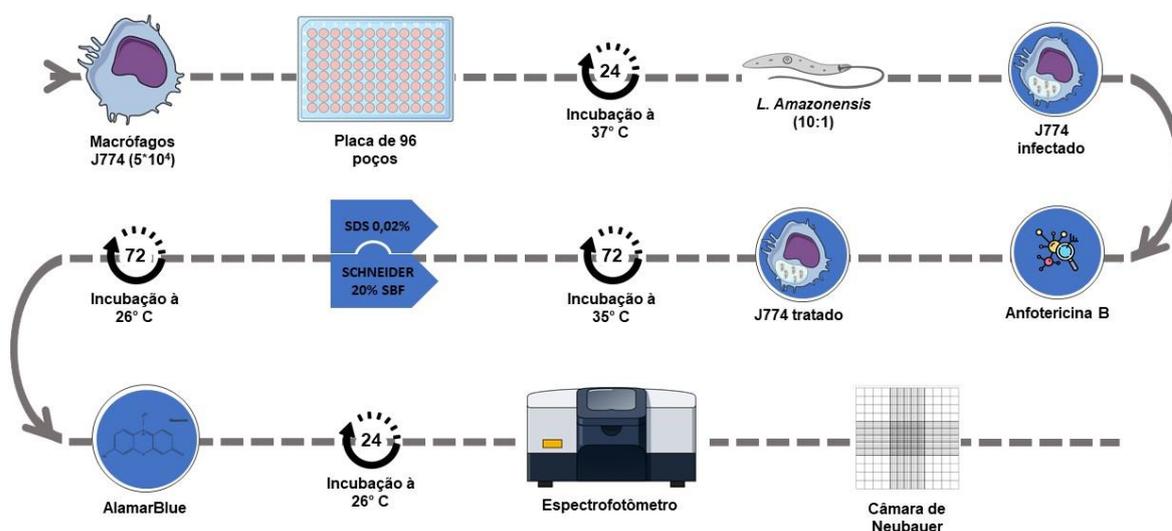


Figura 9. Ensaio colorimétrico semi-automatizado para teste de atividade anti-*Leishmania*.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi obtida em ensaios utilizando a linhagem de macrófagos murinos J774. Células J774 foram distribuídas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^4 células/poço em 200 μL de meio RPMI-1640, pH 7,2 ~ 7,4, (Gibco) suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina e cultivadas a uma temperatura de 37° C e 5% de CO_2 por 24 h. Os compostos foram testados nas concentrações de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 μM . A menadiona (Sigma/Aldrich St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como controle

de citotoxicidade na concentração de 50 μM . O DMSO, utilizado para diluição dos compostos, foi utilizado na concentração máxima de 4%.

A viabilidade dos macrófagos foi avaliada a partir do metabolismo do resazurina, utilizando o reagente AlamarBlue[®] (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram tratadas durante 72 h. Após esse período, o AlamarBlue[®] foi adicionado (20 μL por poço) e os macrófagos foram incubados sob as mesmas condições por mais 24 h. A análise colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. O valor de CC_{50} foi calculado com base na porcentagem de inibição do crescimento celular, em relação ao grupo controle não tratado.

4.5 INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS J774 COM *L. AMAZONENSIS*

Macrófagos da linhagem J774 (5×10^4 células/poço) foram cultivados em placa de 96 poços em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina a 37° C, 5% CO_2 . Após 24 horas, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* em estágio estacionário de crescimento, em uma proporção de 10 parasitos por macrófago durante 24 h à temperatura de 35° C em 5% CO_2 . Os macrófagos infectados foram tratados com os compostos em concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 e 1.56 μM durante 72 h para obtenção de curva concentração-resposta. Uma triagem inicial foi realizada utilizando duas concentrações, 50 e 10 μM , para identificar os compostos da classe das hidrazonas mais promissores. Após o tratamento, para permitir a liberação das amastigotas do meio intracelular, os poços foram incubados com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) 0,02%, por 30 min a 37° C e 5% de CO_2 . Em seguida, o meio Schneider foi adicionado para uma concentração final de 20% SBF e 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas à 26° C, modificado de Papageorgiou e Soteriadou (2002). A sobrevivência intracelular e a viabilidade de *L. amazonensis* foi mensurada por meio do ensaio de AlamarBlue[®] após 72 horas de incubação a 26° C, quando os parasitos estavam diferenciados em formas promastigotas exibindo um flagelo externo móvel. O grupo controle negativo foi representado por macrófagos infectados e sem tratamento, enquanto que células infectadas e tratadas com anfotericina B na concentração de 2 μM foi o controle positivo. Células não infectadas

(*mock*) foram o branco da leitura no espectrofotômetro. A análise colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O cálculo de IC₅₀ foi realizado utilizando-se o *software* Graph Pad Prism® versão 8.0.1 por meio de regressão não linear a partir do Log das concentrações testadas e da porcentagem de inibição do número de parasitos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas utilizando o *software* Graph Pad Prism® versão 8.0.1 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Os cálculos de IC₅₀ e CC₅₀ foram realizados por regressão não linear a partir do Log das concentrações testadas e da porcentagem de inibição do número de parasitos. O teste de Mann Whitney (útil em comparar dois grupos distintos, em um cenário onde, ao menos um desses grupos não é paramétrico) foi utilizado para comparar as médias dos valores de IC₅₀ entre as moléculas testadas e a anfotericina B e entre os métodos empregados para cálculo de IC₅₀. O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀ para cada composto analisado. As diferenças foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO PARA TESTE DE ATIVIDADE ANTI-*Leishmania*

O valor de IC_{50} da anfotericina B variou entre os métodos, tendo a contagem manual de promastigotas demonstrado um valor menor ($0,203 \pm 0,09 \mu\text{M}$) do que o valor encontrado com o ensaio de AlamarBlue® ($0,295 \pm 0,02 \mu\text{M}$). No entanto, não houve diferença estatística entre os valores de IC_{50} encontrados ($p = 0,3429$) (Figura 10). A correlação de Spearman ($r = 0,4$) aponta para uma moderada correlação positiva entre os métodos testados. Sendo assim, o método colorimétrico padronizado foi utilizado para as triagens subsequentes dos compostos.

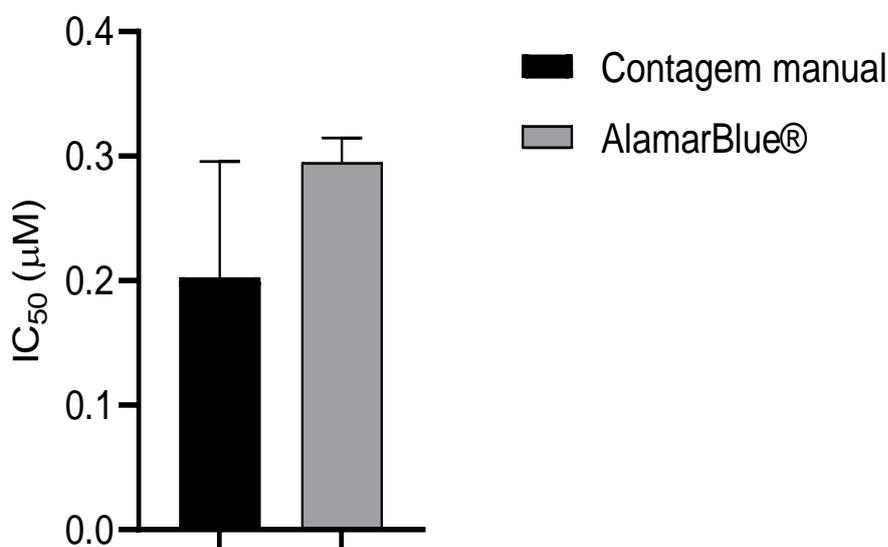


Figura 10. Comparação entre os valores de IC_{50} da anfotericina B encontrados, com o método de contagem manual de promastigotas de *L. amazonensis* e a espectrofotometria através do ensaio de AlamarBlue®. Média \pm desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata ($p = 0,3429$).

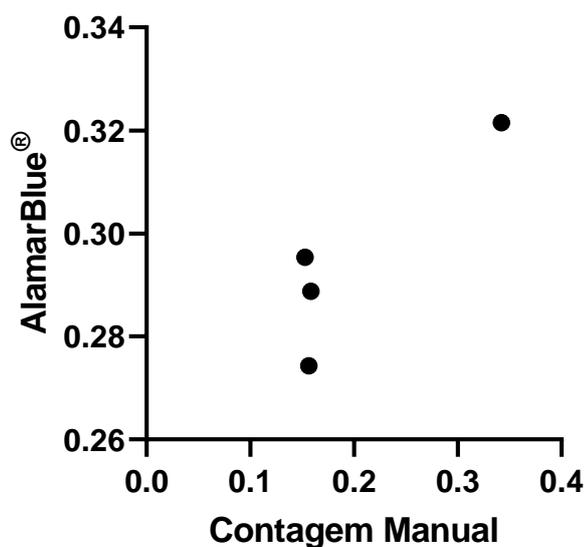


Figura 11. Correlação de Spearman entre a contagem manual e de promastigotas de *L. amazonensis* utilizando câmara de Neubauer e a espectrofotometria através do ensaio de AlamarBlue® de dois experimentos realizados em quadruplicata ($r = 0,4$)

5.2 TRIAGEM DE COMPOSTOS DA CLASSE DAS HIDRAZONAS

Após submetermos os 26 compostos da classe das hidrazonas testados inicialmente com o objetivo de avaliar a citotoxicidade, obtivemos os resultados mostrados na Figura 12, onde é possível observar que apenas o composto MM24 apresentou a porcentagem de inibição superior a 20%. Os demais compostos não apresentaram citotoxicidade. A Figura 12 mostra a média dos valores de porcentagem de inibição de todas as hidrazonas testadas. Todos os compostos da classe das hidrazonas apresentaram porcentagem de citotoxicidade inferior a 50% na concentração de 50 μM . Os valores de CC_{50} das moléculas MM20 e MM24 estão descritos na Tabela 5.

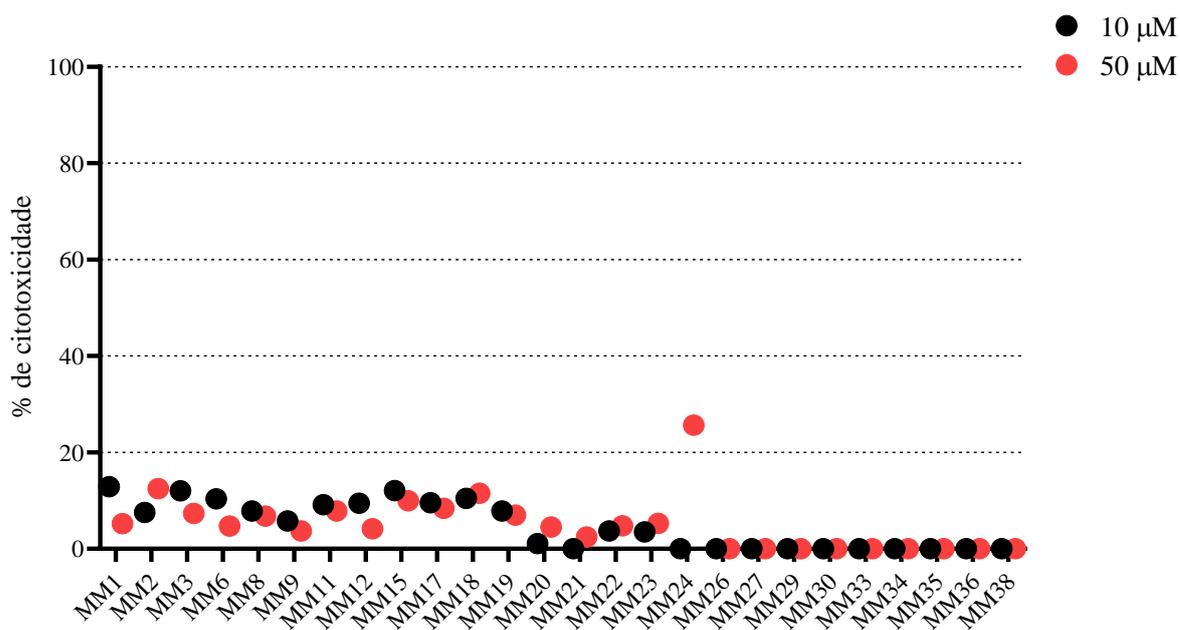


Figura 12. Porcentagem de citotoxicidade de hidrazonas em células da linhagem J774. Células da linhagem de macrófagos J774 foram tratadas com compostos da classe das hidrazonas, nas concentrações de 10 e 50 μM , durante 72 horas. Em seguida, o AlamarBlue® foi adicionado nas culturas de células para medir a viabilidade das amostras. Os valores correspondem à média de um experimento realizado em quadruplicata, de dois ensaios realizados.

Tabela 5. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de compostos da classe das hidrazonas

COMPOSTO	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IS
MM24	112,1 \pm 5,53	23,8 \pm 0,18	4,72
MM20	>120	19,6 \pm 4,83	>6,13
Anfotericina B	>50	0,25 \pm 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade. Média \pm desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

Dos 26 compostos testados, somente MM20 e o MM24 apresentaram atividade antiparasitária superior a 70%. Nesse caso, o MM20 reduziu em 77,9% a viabilidade das amastigotas, enquanto que o MM24 inibiu em 100% o número de parasitos viáveis, ambos na concentração de 50 μM (Figura 13). A Figura 13 mostra a média dos valores de porcentagem de atividade anti-*Leishmania* de todas as hidrazonas testadas.

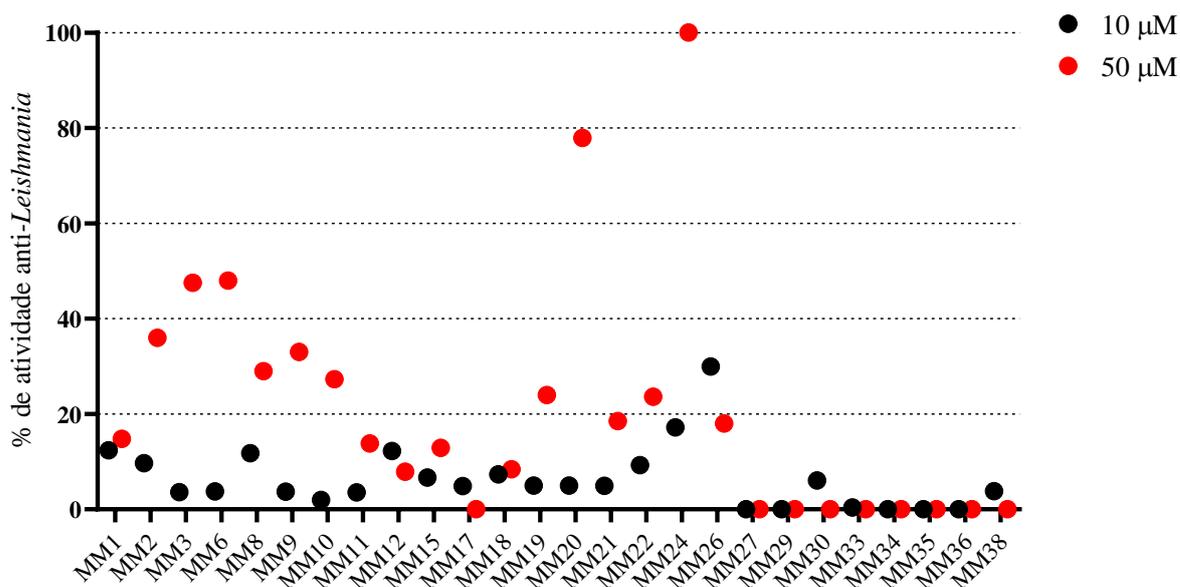


Figura 13. Porcentagem de atividade contra amastigotas de *Leishmania* de hidrazonas. Células da linhagem de macrófagos J774 foram infectadas com *L. amazonensis* e tratadas com compostos da classe das hidrazonas, nas concentrações de 10 e 50 µM, durante 72 horas. Em seguida, os macrófagos foram lisados e a viabilidade dos parasitos foi avaliada com o AlamarBlue®, a 26° C. O gráfico mostra a média de um experimento realizado em quadruplicata, de dois ensaios realizados.

5.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-*Leishmania* DOS DEMAIS COMPOSTOS

As duas hidrazonas de maior atividade e outros 20 compostos de diferentes grupos químicos (o composto lapachol livre, os complexos metálicos contendo rutênio e o precursor do complexo metálico, a mefloquina, os complexos metálicos contendo 4-aminoquinolina, o composto lausona livre e o composto na forma complexada com rutênio, o composto alizarina livre e um composto na forma complexada com rutênio, o complexo metálico contendo atovaquona e os compostos tiossemicarbazonas e o ligante) foram submetidos à avaliação da citotoxicidade.

A Tabela 6 mostra o resultado de CC₅₀ dos complexos contendo 4-aminoquinolina, cujos valores variaram de 12,7 µM a 100 µM. A menadiona, utilizada como controle citotóxico, inibiu 100% da viabilidade celular na concentração de 50 µM. A anfotericina B, utilizada como controle nos experimentos de infecção *in vitro*, não apresentou toxicidade em concentrações menores ou igual a 50 µM.

O complexo contendo lausona atingiu um valor de CC₅₀ de 12,78 µM, sendo que a molécula livre atingiu um valor superior, chegando a 100 µM (Tabela 7). Os

compostos contendo lapachol exibiram valores de CC_{50} que variaram de 10,9 a 54,1 μM , sendo que o composto livre atingiu o valor de 100 μM (Tabela 8). O complexo contendo alizarina atingiu um valor de CC_{50} de 26,8 μM , sendo que a molécula livre atingiu um valor superior de 89,7 μM (Tabela 9). O complexo metálico contendo a naftoquinona atovaquona exibiu um valor de CC_{50} de 46,4 μM (Tabela 10). Os compostos de tiossemicarbazona foram os compostos menos citotóxicos, com todos os compostos da classe exibindo valores de CC_{50} acima de 100 μM (Tabela 11).

Em relação às 26 moléculas da classe das hidrazonas, em vista dos resultados dos dois compostos de maior inibição encontrados após a triagem inicial (MM20 e MM24), ambos foram submetidos a outros experimentos que elucidaram seus respectivos valores de CC_{50} , IC_{50} e o índice de seletividade (IS). Em relação aos ensaios de citotoxicidade, a molécula MM20 foi a menos tóxica para os macrófagos J774 com um valor de CC_{50} de 120 μM , e a molécula MM24 demonstrou um CC_{50} de 112,1 μM , sendo também um composto de baixa toxicidade para a célula hospedeira. Para o ensaio de atividade leishmanicida o composto MM20 foi o mais efetivo em dirimir a infecção intracelular com um valor de IC_{50} de 19,6 μM , apenas um pouco menor do que o valor de 23,8 μM do composto MM24. Pelo exposto, podemos observar que ambos compostos, que foram selecionados a partir da triagem inicial desta classe, demonstraram potencial atividade antiparasitária contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, tendo o composto MM20 o maior IS da classe (6,13), seguido do MM24 (4,72) (Tabela 5).

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 6, nenhum dos cinco complexos contendo 4-aminoquinolinas, nem a mefloquina livre, apresentou atividade anti-*Leishmania* superior ao da anfotericina B. Entre os compostos testados, o WV-74 e o WV-86 foram os mais seletivos, enquanto que o WV_q-92, o complexo contendo 4-aminoquinolina não-substituída, foi o menos ativo. O WV-74 foi o composto com o maior índice de seletividade de todos os 46 compostos testados (>8,34).

Tabela 6. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de complexos metálicos contendo 4-aminoquinolina

COMPOSTO	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IS
Mefloquina	31,3 \pm 0,72	7,2 \pm 2,35	4,38
WV_q-92	12,7 \pm 0,2	7,4 \pm 0,05	1,72

WV-60	14,8 ± 0,1	3,3 ± 0,06	4,50
WV-65	19,2 ± 0,1	3,7 ± 0	5,19
WV-86	18,2 ± 0,35	3,2 ± 0,4	5,69
WV-74	>100	12,0 ± 1,15	>8,34
Anfotericina B	>50	0,25 ± 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade.
*Média ± desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

A lausona livre e um composto derivado na forma complexada com o metal rutênio foram testados, e apenas a molécula livre demonstrou ação leishmanicida com um valor de IC₅₀ de 25,2 µM e um IS baixo, de apenas 0,50 (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de complexos metálicos contendo lausona

COMPOSTO	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IS
LAW	>100	SA	NC
AQLAW	12,7 ± 2,24	25,2 ± 0,66	0,50
Anfotericina B	>50	0,25 ± 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade; SA = Sem atividade anti-*Leishmania*; NC = Não calculado. *Média ± desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

O composto lapachol livre, três complexos metálicos contendo rutênio e o precursor do complexo metálico foram submetidos ao ensaio anti-*Leishmania*, e, deste grupo, apenas dois compostos na forma complexada (AQLAPM e AQLAP) demonstraram ação leishmanicida com valores de IC₅₀ de 21,7 e 11,5 µM e valores de IS baixos de apenas 0,52 e 0,95, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de complexos metálicos contendo lapachol

COMPOSTO	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IS
LAP	>100	SA	NC

AQLAPM	41,5 ± 0,09	21,7 ± 1,10	0,52
AQLAP	10,9 ± 0,47	11,5 ± 1,81	0,95
AQUA	39,3 ± 4,05	SA	NC
RuCl(LAP)	54,1 ± 7,06	SA	NC
Anfotericina B	>50	0,25 ± 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade; SA = Sem atividade anti-*Leishmania*; NC = Não calculado. *Média ± desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

O composto alizarina livre e um composto derivado na forma complexada com rutênio apresentaram atividade leishmanicida com valores de IC₅₀ de 40,9 µM para a forma livre, o maior entre os compostos testados, e de 20,4 µM para a forma complexada com o metal rutênio (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de complexos metálicos contendo alizarina

COMPOSTO	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IS
ALIZ	89,7 ± 4,32	40,9 ± 1,35	0,46
AQALIZ	26,8 ± 3,49	20,4 ± 3,13	0,76
Anfotericina B	>50	0,25 ± 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade. *Média ± desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

O complexo metálico contendo a naftoquinona atovaquona e o metal rutênio apresentou atividade leishmanicida contra a forma amastigota intracelular do parasito, exibindo um valor de IC₅₀ de 25,4 µM e de IS de 1,83 (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de complexo metálico contendo atovaquona

COMPOSTO	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IS
RuCl(ATO)	46,4 ± 0,08	25,4 ± 0,18	1,83
Anfotericina B	>50	0,25 ± 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade. *Média ± desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

Nenhuma das quatro tiossemicarbazonas testadas apresentou qualquer atividade anti-*Leishmania* na concentração máxima testada de 50 μ M. E não houve diferença entre o ligante e as formas complexadas com metais (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania* de compostos da classe das tiossemicarbazonas

COMPOSTO	CC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IS
Ligante	>100	SA	NC
Complexo Ni	>100	SA	NC
Complexo Pt	>100	SA	NC
Complexo Pd	>100	SA	NC
Anfotericina B	>50	0,25 \pm 0,06	>200

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%; IS = Índice de seletividade; SA = Sem atividade anti-*Leishmania*; NC = Não calculado. *Média \pm desvio padrão de dois experimentos representativos realizados em quadruplicata.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo, primeiramente realizamos a padronização de um método semi-automatizado, comparando os valores de IC₅₀ da anfotericina B obtidos pelo ensaio de AlamarBlue® e pela contagem manual de promastigotas de *L. amazonensis*. O método de AlamarBlue® é um indicador de viabilidade celular que se baseia no metabolismo da resazurina (azul e não fluorescente) que é reduzida em resorufina (rosa e fluorescente), alterando a coloração, pelo metabolismo celular (BUENO et al., 2002). Após a validação do método, 46 compostos foram triados.

O método de aferição da viabilidade celular por meio da redução da resazurina já foi empregado em diversos contextos, por exemplo: detectar contaminação do leite por bactérias (PESCH; SIMMERT, 1929); aferir a qualidade do sêmen bovino (ERB; EHLERS, 1950) e equino (CARTER et al., 1998); quantificar a sensibilidade de parasitos a determinadas drogas (RÄZ et al., 1997; MIKUS; STEVERDING, 2000); verificar a viabilidade de células de mamíferos (ANOOPKUMAR-DUKIE et al., 2005).

Os nossos resultados mostram que a utilização do referido teste colorimétrico consegue detectar a redução do número de parasitos após o tratamento com a anfotericina B. Como demonstrado na literatura, o ensaio baseado na redução da resazurina é bastante eficaz para estimar a densidade de promastigotas de parasitos do gênero *Leishmania* em triagens de drogas, com a vantagem de ser mais rápido, ser simples, reproduzível, possuir baixo custo, permitir aumento da escala de triagem, requerer apenas equipamentos básicos, além de ser atóxico para as células.

As desvantagens na utilização deste método incluem os limites de detecção referentes ao leitor de placa utilizado e a aferição indireta da atividade (MIKUS; STEVERDING, 2000; CORRAL et al., 2013). Alguns autores descrevem como desvantagem a representação não exata do modelo da doença em humanos devida à utilização de formas amastigotas axênicas ou da realização da etapa de tratamento em formas promastigotas (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Entretanto, nosso trabalho tentou dirimir esta limitação utilizando uma cepa infecciosa, promovendo uma infecção intracelular, momento no qual as formas amastigotas foram submetidas ao tratamento, e realizando a lise da célula hospedeira para permitir a diferenciação do parasito (YANG; LIEW, 1993; PAPAGEORGIOU; SOTERIADOU, 2002; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). A adição de SDS objetivando a lise da célula hospedeira

com liberação de amastigotas intracelulares e subsequente transformação em promastigotas nos permite avaliar a sobrevivência do parasito com maior precisão, além de impedir a metabolização do corante pela célula hospedeira (KIDERLEN; KAYE, 1990; BILBAO-RAMOS et al., 2012).

Dentre as vantagens na utilização do método de AlamarBlue frente ao método de MTT e derivados, baseados na redução de sais de tetrazólio, largamente utilizados para aferição do metabolismo celular, podemos citar: solúvel em meio de cultura, não requer lise da célula em estudo, indicado tanto para células aderente quanto para células não-aderentes, não necessita de composto secundário para sua redução, atóxico para as células e para o técnico, possui alta simplicidade, baixo custo, é reduzida pelos citocromos, além de FMNH₂, FADHs, NADH e NADPH, etc (BUENO et al., 2002; RAMPERSAD, 2012). Um ensaio que testou 117 compostos em uma triagem *high throughput* demonstrou que o método de AlamarBlue foi mais sensível do que o ensaio de MTT para a maioria dos compostos com a linhagem celular HepG2 (HAMID et al., 2004). Em um estudo que comparou o desempenho do MTT com o AlamarBlue na atividade de compostos com possível efeito anticâncer *in vitro*, os autores ressaltaram a vantagem deste último quanto a maior sensibilidade, maior precisão, independência da atividade com relação a linhagem celular, melhor linearidade com o número de células, etc (ZAVERI et al., 2013). Em uma pesquisa avaliando a viabilidade de células epiteliais da córnea humana, o ensaio de AlamarBlue se mostrou similar ao PrestoBlue e superior ao MTT, com este último detectando 5000 células após 3 h de incubação, enquanto tanto o PrestoBlue quanto o AlamarBlue detectaram a mesma quantidade de células com apenas 30 min de incubação (XU; MCCANNA; SIVAK, 2015).

Dos quatro compostos que apresentaram índice de seletividade superior a cinco, três (75%) são complexos metálicos contendo 4-aminoquinolina o que corrobora a potencial atividade anti-*Leishmania* de moléculas deste grupo. Entretanto, a anfotericina B foi superior em termos de seletividade, devido à alta atividade antiparasitária e baixa toxicidade *in vitro*. O valor médio do índice de seletividade calculado para o grupo das 4-aminoquinolinas foi de 4,74. O complexo metálico WV-74 apresentou um IS 52,5% maior que o da mefloquina livre. O que condiz com o entendimento de que a associação de um composto com um metal pode melhorar a atividade biológica de tal composto (DHANARAJ; JOHNSON, 2015). Já foi demonstrado que drogas conhecidas dessa classe, como a cloroquina e a

hidroxicloroquina, possuem atividade significativa contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, além de reduzir a carga parasitária em animais infectados (ROCHA et al., 2013). Outros compostos dessa classe também demonstraram efeito leishmanicida contra *L. amazonensis* (ANTINARELLI et al., 2016). A espécie *L. infantum* também mostrou-se susceptível ao tratamento da infecção *in vivo* por um composto derivado das 4-aminoquinolinas, sem efeitos adversos significativos no animal (KONSTANTINOVIĆ et al., 2018; MANZANO et al., 2019).

Em relação aos compostos contendo naftoquinonas na sua composição nós não encontramos atividade anti-*Leishmania* suficientemente alta para considerá-los eficientes frente à infecção *in vitro* com amastigotas, sendo o maior valor de IS encontrado dentre estes compostos de apenas 1,83, referente ao complexo de atovaquona. Não houve diferença entre o lapachol livre, o precursor ou os complexos, sendo o maior IS desse grupo 0,95. A alizarina livre e a forma complexada também não demonstraram grandes diferenças exibindo valores de IS de 0,46 e 0,76, respectivamente. Apesar deste grupo ter exibido alguma atividade anti-*Leishmania*, baixos valores de IS revelou-o pouco eficiente. Apenas a forma complexada da lausona demonstrou discreta atividade leishmanicida ($IC_{50} = 25,2$ e $IS = 0,50$).

Nossos resultados contrapõem-se a alguns trabalhos encontrados na literatura, como o de Murray e Hariprashad (1996) que testou a atovaquona por meio de tratamento em oral de camundongos BALB/c, infectados com *L. donovani*, e sugeriu que a droga possa ser utilizada como um aliado no tratamento da leishmaniose. Nossos achados sobre o lapachol diferem do que encontrou Teixeira et al. (2001) quando realizou testes *in vitro* contra a espécie *L. braziliensis*. Também em ensaios utilizando a infecção com *L. amazonensis* derivados do lapachol foram capazes de dirimir a colonização de macrófagos humanos derivados de PBMC *in vitro* (SOUZA-SILVA et al., 2014). Outras espécies do gênero *Leishmania* já foram submetidas a ensaios visando aferir sua susceptibilidade a compostos naftoquinônicos, por exemplo: amastigotas de *L. major*-GFP infectando BMDM (ALI et al., 2011); *L. braziliensis* infectando hamsters (COSTA et al., 2014); *L. chagasi*, infectando macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (DE ARAÚJO et al., 2017); a cepa transgênica iRFP-*Leishmania infantum* (PÉREZ-PERTEJO et al., 2019).

A despeito da baixa toxicidade exibida pelos compostos da classe das tiossemicarbazonas, nenhum composto desta classe demonstrou qualquer ação leishmanicida na concentração máxima testada de 50 μ M. Não houve diferença entre

o ligante e os complexos metálicos. Os resultados obtidos no nosso estudo vão de encontro ao encontrado em estudos realizados com outros membros dessa classe frente a infecção por *L. amazonensis* (BRITTA et al., 2012; BRITTA et al., 2014; SCARIOT et al., 2017; DA SILVA et al., 2017; TEMRAZ et al., 2018). Não obstante, a baixa toxicidade celular observadas em nossos experimentos corroboram os achados de outros estudos para este grupo de compostos em ensaios de infecção por *Leishmania* (SCARIOT et al., 2017; DA SILVA et al., 2017; TEMRAZ et al., 2018).

Das 26 moléculas da classe das hidrazonas testadas em nosso estudo, dois compostos (MM20 e o MM24) apresentaram atividade antiparasitária superior a 70%, na concentração de 50 μ M. Sendo assim calculamos o IS dos referidos compostos, tendo o composto MM20 o maior IS da classe, (>6,13) seguido do MM24 (4,72), esses dois compostos ficaram entre os seis compostos de maior IS obtidos no nosso estudo. Similar ao encontrado em nossa pesquisa, a literatura mostra que diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania* mostraram-se susceptíveis ao tratamento com compostos da classe das hidrazonas na infecção de macrófagos com *L. donovani in vitro* (JAISWAL et al., 2016); uma outra hidrazona demonstrou elevada ação leishmanicida em amastigotas (ROMERO et al., 2017); um trabalho revelou a grande atividade anti-*L. panamensis* de um composto derivado das hidrazonas (VARGAS et al., 2017); amastigotas de *L. amazonenses* foram susceptíveis ao tratamentos com hidrazonas após infecção de macrófagos murinos *in vitro* (COIMBRA et al., 2019); diversas hidrazonas foram submetidas a um ensaio contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, e vários demonstraram ação leishmanicida (DA SILVA et al., 2020). Alguns destes estudos reforçam nossos resultados que indicaram uma baixa toxicidade, para a célula hospedeira, observada nos membros desta classe (ROMERO et al., 2017; VARGAS et al., 2017; DA SILVA et al., 2020).

Apenas quatro (28,6%) dos 14 complexos de coordenação avaliados neste trabalho demonstraram possuir alguma atividade anti-*Leishmania* relevante, todos (WV-60, WV-65, WV-86 e WV-74) relacionados às 4-aminoquinolinas.

Apesar do grande potencial referido na literatura apresentado por complexos com o metal rutênio para aumentar a efetividade terapêutica de compostos, em nosso estudo, nenhum complexo de coordenação possuindo este metal demonstrou potente ação leishmanicida, indo de encontro a alguns resultados encontrados em outros trabalhos (MELO PEREIRA et al., 2010; MARTÍNEZ et al., 2012; INIGUEZ et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2019).

Para o melhor entendimento da ação anti-*Leishmania* dos compostos aqui apresentados (com um foco nos compostos MM20, WV-65, WV-86 e WV-74), será necessária a realização de novos testes, como os propostos na Figura 14.

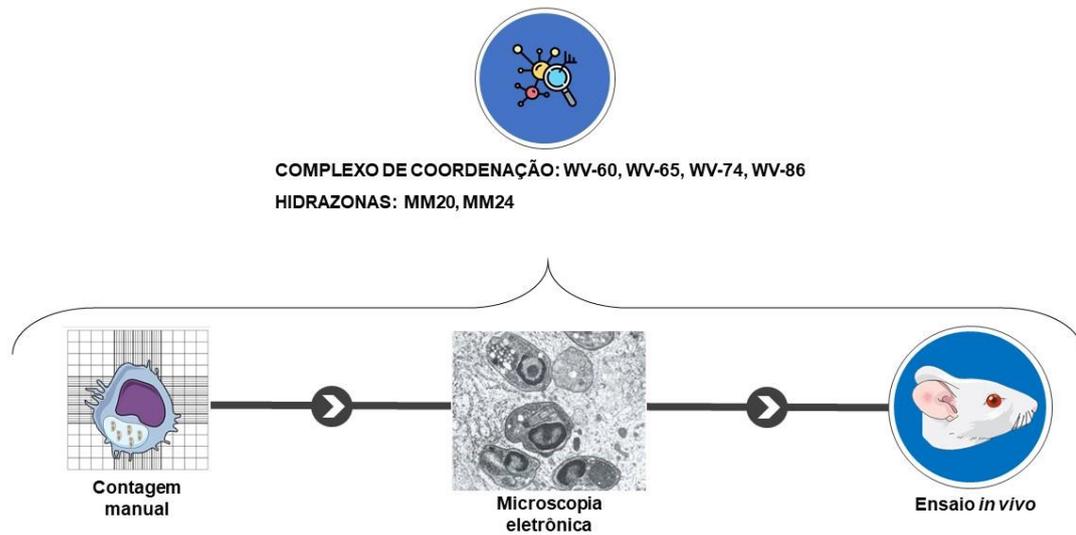


Figura 14. Esquema referente aos próximos ensaios com os compostos mais promissores.

7 CONCLUSÃO

O método colorimétrico de redução da resazurina mostrou ser eficiente na identificação de moléculas com potencial atividade anti-*Leishmania*, reduzindo o tempo e o viés observacional de métodos convencionais. Quatro compostos sintéticos inéditos avaliados nesse estudo mostraram-se promissores em diminuir a infecção por *L. amazonensis* e seguirão para ensaios posteriores.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. S.; LEE, D.-U. Syntheses, crystal structure, hirshfeld surfaces, fluorescence properties, and DFT analysis of benzoic acid hydrazone schiff bases. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 145, p. 563–574, 15 jun. 2015.
- AL-BARI, M. A. A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1608–1621, 2015.
- ALCÂNTARA, L. M. et al. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430–439, 28 set. 2018.
- ALI, A. et al. Structure/Antileishmanial activity relationship study of naphthoquinones and dependency of the mode of action on the substitution patterns. **Planta Medica**, v. 77, n. 18, p. 2003–2012, dez. 2011.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 31 maio 2012.
- ANOOPKUMAR-DUKIE, S. et al. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. **The British Journal of Radiology**, v. 78, n. 934, p. 945–947, 1 out. 2005.
- ANTINARELLI, L. M. R. et al. Aminoquinoline Compounds: Effect of 7-Chloro-4-Quinolinyldhydrazone Derivatives against *Leishmania Amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 10–16, 1 dez. 2016.
- ANTOINE, J.-C. et al. The Biogenesis and Properties of the Parasitophorous Vacuoles That Harbour *Leishmania* in Murine Macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392–401, 1 out. 1998.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Thematic Issue: Emerging Parasite Zoonoses. v. 30, n. 12, p. 1269–1281, 1 nov. 2000.
- BACHA, H. A. et al. *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis* Identification by PCR in the State of Para, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 3, p. 173–178, mar. 2011.
- BELO, V. S. et al. Risk factors for adverse prognosis and death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 24 jul. 2014.
- BERGAMO, A. et al. Approaching Tumour Therapy beyond Platinum Drugs: Status of the Art and Perspectives of Ruthenium Drug Candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 90–99, 1 jan. 2012.

- BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium Anticancer Compounds: Myths and Realities of the Emerging Metal-Based Drugs. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 31, p. 7817–7823, 21 ago. 2011.
- BILBAO-RAMOS, P. *et al.* A Fluorometric Method for Evaluation of Pharmacological Activity against Intracellular *Leishmania* Amastigotes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 1, p. 8–11, 1 abr. 2012.
- BOSAK, A. *et al.* Structural Aspects of 4-Aminoquinolines as Reversible Inhibitors of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 101–109, 1 ago. 2019.
- BRAGA, S. F. P. *et al.* Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Thiosemicarbazones and Their Thiazole Derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 299–308, jun. 2016.
- BRANDÃO, G. C. *et al.* Antimalarial Naphthoquinones. Synthesis via Click Chemistry, in Vitro Activity, Docking to Pf DHODH and SAR of Lapachol-Based Compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 191–205, fev. 2018.
- BRASIL. **Manual de terapêutica da malária**. 6. ed. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2001.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R.; WARD, S. A. 4-Aminoquinoline Resistance of *Plasmodium Falciparum*: Insights from the Study of Amodiaquine Uptake. **Molecular Pharmacology**, v. 50, n. 6, p. 1551–1558, 1 dez. 1996.
- BRITTA, E. A. *et al.* Benzaldehyde Thiosemicarbazone Derived from Limonene Complexed with Copper Induced Mitochondrial Dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 1 ago. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411600/>>. Acesso em: 2 abr. 2020.
- BRITTA, E. A. *et al.* Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, 26 set. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188478/>>. Acesso em: 2 abr. 2020.
- BUENO, C. *et al.* The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 4, p. 385–390, 2002.
- BUITRAGO, R. *et al.* PCR-RFLP of Ribosomal Internal Transcribed Spacers Highlights Inter and Intra-Species Variation among *Leishmania* Strains Native to La Paz, Bolivia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 557–563, abr. 2011.
- CARTER, R. A. *et al.* Assessing the Fertility Potential of Equine Semen Samples Using the Reducible Dyes Methylene Green and Resazurin. **Archives of Andrology**, v. 40, n. 1, p. 59–66, 1 jan. 1998.

CDC. CDC - Malaria - Travelers - Choosing a Drug to Prevent Malaria. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/travelers/drugs.html>>. Acesso em: 31 mar. 2020.

CERQUEIRA, J. V. *et al.* Anti-Inflammatory Activity of SintMed65, an N-Acylhydrazone Derivative, in a Mouse Model of Allergic Airway Inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 105735, out. 2019.

CHAVES, S. P. *et al.* Modulation of P2X7 Purinergic Receptor in Macrophages by *Leishmania Amazonensis* and Its Role in Parasite Elimination. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 10–11, p. 842–849, set. 2009.

CLAVEL, C. M. *et al.* Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium(II)–Arene Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 3356–3365, 23 abr. 2015.

COIMBRA, E. S. *et al.* Synthesis, Biological Activity, and Mechanism of Action of New 2-Pyrimidinyl Hydrazone and N-Acylhydrazone Derivatives, a Potent and New Classes of Antileishmanial Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 184, p. 111742, dez. 2019.

CORRAL, M. J. *et al.* Improvement of 96-Well Microplate Assay for Estimation of Cell Growth and Inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 2, p. 111–116, ago. 2013.

CORTEGIANI, A. *et al.* A Systematic Review on the Efficacy and Safety of Chloroquine for the Treatment of COVID-19. **Journal of Critical Care**, 10 mar. 2020.

COSTA, L. *et al.* Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109672, 23 out. 2014.

CROFT, S. L.; BRAZIL, R. P. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 76, n. 1, p. 37–43, 1 fev. 1982.

DA SILVA, A. C. *et al.* Aryl Thiosemicarbazones: In Vitro and Immunomodulatory Activities against *L. Amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 57–65, 1 jun. 2017.

DA SILVA, E. T. *et al.* In Vitro Assessment of Camphor Hydrazone Derivatives as an Agent Against *Leishmania Amazonensis*. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 1, p. 203–207, mar. 2020.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653–660, 1 jul. 2009.

DAWSON, L. J. Hydroxychloroquine Therapy in Patients with Primary Sjogren’s Syndrome May Improve Salivary Gland Hypofunction by Inhibition of Glandular Cholinesterase. **Rheumatology**, v. 44, n. 4, p. 449–455, 3 fev. 2005.

DE ARAÚJO, M. V. *et al.* Evaluation on the Leishmanicidal Activity of 2-N,N'-Dialkylamino-1,4-Naphthoquinone Derivatives. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 46–51, 1 maio 2017.

DE ARAÚJO NETO, L. N. *et al.* Thiophene-Thiosemicarbazone Derivative (L10) Exerts Antifungal Activity Mediated by Oxidative Stress and Apoptosis in *C. Albicans*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 109028, 1 abr. 2020.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of Anti-Leishmanial Pentavalent Antimonial Drugs by a Parasite-Specific Thiol-Dependent Reductase, TDR1. **Biochemical Journal**, v. 381, n. 2, p. 405–412, 15 jul. 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Advances on some vector-borne diseases. v. 27, n. 5, p. 305–318, 1 set. 2004.

DHANARAJ, C. J.; JOHNSON, J. Quinoxaline Based Bio-Active Mixed Ligand Transition Metal Complexes: Synthesis, Characterization, Electrochemical, Antimicrobial, DNA Binding, Cleavage, Antioxidant and Molecular Docking Studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 100–109, 1 out. 2015.

DONATE-CORREA, J. *et al.* Pentoxifylline for Renal Protection in Diabetic Kidney Disease. A Model of Old Drugs for New Horizons. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 3, 27 fev. 2019.

D'SOUSA, C. O. *et al.* Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 104367–104392, 1 nov. 2017.

DUBAR, F. *et al.* The Ferroquine Antimalarial Conundrum: Redox Activation and Reinvasion Inhibition. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 52, n. 30, p. 7690–7693, 22 jul. 2013.

EKENGARD, E. *et al.* Antimalarial Activity of Ruthenium(II) and Osmium(II) Arene Complexes with Mono- and Bidentate Chloroquine Analogue Ligands. **Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)**, v. 44, n. 44, p. 19314–19329, 28 nov. 2015.

ERB, R. E.; EHLERS, M. H. Resazurin Reducing Time as an Indicator of Bovine Semen Fertilizing Capacity. **Journal of Dairy Science**, v. 33, n. 12, p. 853–864, 1 dez. 1950.

FAREED, G. *et al.* Structure activity relationship: Antioxidant potential of some novel Schiff bases containing benzophenone moiety. **Int. J. Curr. Pharm. Res**, v. 5, p. 61–64, 2013.

FARRELL, N. P. Multi-Platinum Anti-Cancer Agents. Substitution-Inert Compounds for Tumor Selectivity and New Targets. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 24, p. 8773–8785, 30 nov. 2015.

FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; ALGRANATI, I. D. Differential Effects of Paromomycin on Ribosomes of *Leishmania Mexicana* and Mammalian Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 86–93, jan. 2011.

FIELD, M. C. *et al.* Anti-Trypanosomatid Drug Discovery: An Ongoing Challenge and a Continuing Need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217–231, abr. 2017.

FLOCH, H. *Leishmania tropica guyanensis* n.sp. agent de la leishmaniose tégumentaire des Guyanes et l'Amérique Centrale. v. 328, p. 1–4, 1954.

- FRIK, M. *et al.* In Vitro and in Vivo Evaluation of Water-Soluble Iminophosphorane Ruthenium(II) Compounds. A Potential Chemotherapeutic Agent for Triple Negative Breast Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 23, p. 9995, 11 dez. 2014.
- GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 22 dez. 2017.
- GILBERT, I. H. Drug Discovery for Neglected Diseases: Molecular Target-Based and Phenotypic Approaches. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 7719–7726, 24 out. 2013.
- GLANS, L. *et al.* Synthesis and Biological Activity of Cymantrene and Cyrtetrene 4-Aminoquinoline Conjugates against Malaria, Leishmaniasis, and Trypanosomiasis. **Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)**, v. 41, n. 21, p. 6443–6450, 7 jun. 2012.
- GOODWIN, C. J. *et al.* Microculture Tetrazolium Assays: A Comparison between Two New Tetrazolium Salts, XTT and MTS. **Journal of Immunological Methods**, v. 179, n. 1, p. 95–103, jan. 1995.
- GORE, M. *et al.* Cisplatin/Carboplatin Cross-Resistance in Ovarian Cancer. **British Journal of Cancer**, v. 60, n. 5, p. 767–769, nov. 1989.
- GRAÇA, G. C. da *et al.* Development and Validation of PCR-Based Assays for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis and Identification of the Parasite Species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–674, ago. 2012.
- GUIMARÃES, E. T. *et al.* Potent Immunosuppressive Activity of a Phosphodiesterase-4 Inhibitor N-Acylhydrazone in Models of Lipopolysaccharide-Induced Shock and Delayed-Type Hypersensitivity Reaction. **International Immunopharmacology**, v. 65, p. 108–118, dez. 2018.
- HAMID, R. *et al.* Comparison of Alamar Blue and MTT Assays for High Through-Put Screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 5, p. 703–710, out. 2004.
- HAMULAKOVA, S. *et al.* Tacrine-Coumarin and Tacrine-7-Chloroquinoline Hybrids with Thiourea Linkers: Cholinesterase Inhibition Properties, Kinetic Study, Molecular Docking and Permeability Assay for Blood-Brain Barrier. **Current Alzheimer Research**, v. 15, n. 12, p. 1096–1105, 28 set. 2018.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the Host Macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 1 ago. 2002.
- HENTZER, B.; KOBAYASI, T. The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 157–166, 1 jun. 1977.
- IIDA, J. *et al.* Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, 1 dez. 2016.
- INAM, A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 3-[4-(7-Chloro-Quinolin-4-Yl)-Piperazin-1-Yl]-propionic acid hydrazones as antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 67–76, mar. 2014.

INIGUEZ, E. *et al.* Ruthenium-Clotrimazole Complex Has Significant Efficacy in the Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 164, p. 402–410, 1 dez. 2016.

JAIN, J. S.; SRIVASTAVA, R. S.; SINHA, N. A. and R. **Synthesis and Evaluation of Schiff Bases for Anticonvulsant and Behavioral Depressant Properties**. 3. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/78718/article>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

JAISWAL, A. K. *et al.* Development of *Leishmania Donovanii* Stably Expressing DsRed for Flow Cytometry-Based Drug Screening Using Chalcone Thiazolyl-Hydrazone as a New Antileishmanial Target. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 695–702, dez. 2016.

KALIA, S.; DUTZ, J. P. New Concepts in Antimalarial Use and Mode of Action in Dermatology. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 4, p. 160–174, jul. 2007.

KATEWA, S. D.; KATYARE, S. S. Antimalarials Inhibit Human Erythrocyte Membrane Acetylcholinesterase. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 467–482, jan. 2005.

KIDERLEN, A. F.; KAYE, P. M. A Modified Colorimetric Assay of Macrophage Activation for Intracellular Cytotoxicity against *Leishmania* Parasites. **Journal of Immunological Methods**, v. 127, n. 1, p. 11–18, 20 fev. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, p. 37–42, 1990.

KONSTANTINOVIĆ, J. *et al.* Novel Aminoquinoline Derivatives Significantly Reduce Parasite Load in *Leishmania infantum* Infected Mice. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 7, p. 629–634, 12 jul. 2018.

KUMAGAI, Y. *et al.* The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 221–247, 10 fev. 2012.

KUMAR, B. S. *et al.* Synthesis of Pharmacologically Important Naphthoquinones and Anticancer Activity of 2-Benzylawsone through DNA Topoisomerase-II Inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 1364–1373, fev. 2017.

KYBURZ, D.; BRENTANO, F.; GAY, S. Mode of Action of Hydroxychloroquine in RA—Evidence of an Inhibitory Effect on Toll-like Receptor Signaling. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 9, p. 458–459, set. 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Mato Grosso State, and Observations on Two Distinct Strains of *Leishmania* Isolated from Man and Forest Animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 5, p. 654–667, jan. 1970.

LAMOTTE, S. *et al.* Discovery of Novel Hit Compounds with Broad Activity against Visceral and Cutaneous *Leishmania* Species by Comparative Phenotypic Screening. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 438, 24 jan. 2019.

- LARA, L. S. *et al.* Efficacy of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]-Naphthoquinone Derivatives against Different *Trypanosoma Cruzi* Discrete Type Units: Identification of a Promising Hit Compound. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 572–581, jan. 2018.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6. ed. New York: W.H. Freeman, 2013.
- LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, 1 ago. 2005.
- LIM, L. Y.; GO, M. L. The Anticholinesterase activity of mefloquine. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 12, n. 5, p. 527–531, 1985.
- LINCIANO, P. *et al.* Aryl Thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 423–434, 25 fev. 2018.
- LISIC, E. C. *et al.* Cu(II) propionyl-thiazole thiosemicarbazone complexes: crystal structure, inhibition of human topoisomerase α , and activity against breast cancer cells. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 30–46, 6 jun. 2018.
- MAAROUF, M. *et al.* Biochemical alterations in paromomycin-treated *leishmania donovani* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 83, n. 2, p. 198–202, 1 jan. 1997.
- MACEDO, T. S. *et al.* Platinum(II)–chloroquine complexes are antimalarial agents against blood and liver stages by impairing mitochondrial function. **Metallomics**, v. 9, n. 11, p. 1548–1561, 2017.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Treatment of disseminated leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 945–949, 15 set. 2015.
- MANZANO, J. I. *et al.* 4-Aminoquinoline-based compounds as antileishmanial agents that inhibit the energy metabolism of *Leishmania*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 28–40, out. 2019.
- MARTÍNEZ, A. *et al.* Searching for new chemotherapies for tropical diseases: ruthenium–clotrimazole complexes display high in vitro activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3867–3877, 26 abr. 2012.
- MAUTHE, M. *et al.* Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. **Autophagy**, v. 14, n. 8, p. 1435–1455, 3 ago. 2018.
- MAZURYK, O. *et al.* Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complexes NAMI-A and its reduced form. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 116, p. 11–18, 1 nov. 2012.
- MCCONVILLE, M. J. *et al.* Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 8, p. 368–375, 1 ago. 2007.

MEIRA, C. S. *et al.* Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone- N - acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1971–1985, maio 2018.

MELO PEREIRA, J. C. *et al.* Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4180–4187, 1 set. 2010.

MIKUS, J.; STEVERDING, D. A Simple Colorimetric Method to Screen Drug Cytotoxicity against *Leishmania* Using the Dye Alamar Blue. **Parasitology International**, v. 48, n. 3, p. 265–269, jan. 2000.

mishra, p. *et al.* anti-inflammatory and diuretic activity of a new class of compounds--schiff bases of 3-amino-2-methylquinazolin 4(3H)-ones. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 169–172, 1 abr. 1995.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398–1404, 1 maio 2015.

MONTALVO, A. M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection. **Revista Cubana De Medicina Tropical**, v. 64, n. 2, p. 108–131, ago. 2012.

MORAES, A. D. T. de O. *et al.* 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, nov. 2018.

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J. Activity of oral atovaquone alone and in combination with antimony in experimental Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 586–587, mar. 1996.

NAIR, S. V. *et al.* Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago Rosea*, against *Staphylococcus Aureus* and *Candida Albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 4, p. 237–248, jun. 2016.

NASCIMENTO, N. R. F. do *et al.* In Vitro and in Vivo Leishmanicidal Activity of a Ruthenium Nitrosyl Complex against *Leishmania (Viannia) Braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 192, p. 61–65, 1 abr. 2019.

NAVARRO, M. *et al.* The Mechanism of Antimalarial Action of [Au(CQ)(PPh₃)]PF₆: Structural Effects and Increased Drug Lipophilicity Enhance Heme Aggregation Inhibition at Lipid/Water Interfaces. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 276–282, fev. 2011.

NAVARRO, M. *et al.* Metal-Chloroquine Derivatives as Possible Anti-Malarial Drugs: Evaluation of Anti-Malarial Activity and Mode of Action. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 471, dez. 2014.

NIČ, M. *et al.* (ed.). Hydrazones. In: **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. 2.1.0 ed. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.

NICOLLE, C.; COMTE, C. H. Origine canine du Kala-azar. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 1, p. 299–301, 1908.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of Cutaneous Leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, maio 2011.

OLIVEIRA, T. de S. *et al.* Action of pentoxifylline on experimental cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 477–482, ago. 2000.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, abr. 2005.

O'NEILL, P. M. *et al.* 4-Aminoquinolines—past, present, and future; a chemical perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 29–58, 1 jan. 1998.

OTERO, L. *et al.* Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets †. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3322–3331, jun. 2006.

O'TOOLE, S. A. *et al.* The MTS Assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. **Cancer Detection and Prevention**, v. 27, n. 1, p. 47–54, jan. 2003.

PACHIONI, J. de A. *et al.* Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques**, v. 16, n. 5, p. 742–759, 2013.

PADHYE, S. *et al.* Antitumor metallothiosemicarbazones: structure and antitumor activity of palladium complex of phenanthrenequinone thiosemicarbazone. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1154–1156, mar. 2005.

PADMANABHAN, P. *et al.* Antiviral activity of thiosemicarbazones derived from α -amino acids against dengue virus. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 3, p. 546–552, 2017.

PAPAGEORGIOU, F. T.; SOTERIADOU, K. P. Expression of a novel leishmania gene encoding a histone h1-like protein in *Leishmania major* modulates parasite infectivity in vitro. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6976–6986, dez. 2002.

PASSOS, V. M. A. *et al.* American Cutaneous Leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, p. 968–974, ago. 2000.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 239–255, 20 dez. 2008.

PÉREZ-PERTEJO, Y. *et al.* Antileishmanial activity of terpenylquinones on *Leishmania Infantum* and their effects on *Leishmania* Topoisomerase IB. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 70–79, dez. 2019.

- PÉREZ-REBOLLEDO, A. *et al.* 4-Nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(ii) complexes with significant in vitro anti-trypanosomal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 939–948, 1 maio 2008.
- PESCH, K. L.; SIMMERT, U. Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions. **Kieler Milchw Forsch**, v. 8, p. 551, 1929.
- PETERS, W. **Chemotherapy and drug resistance in malaria**. 2nd. ed. London ; Orlando: Academic Press, 1987.
- PINK, R. *et al.* Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727–740, set. 2005.
- PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. The Trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4570–4590, 10 nov. 2009.
- PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in Leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, dez. 2017.
- PUBCHEM. **Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3330>>. Acesso em: 8 abr. 2020.
- RAJAPAKSE, C. S. K. *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro antimalarial and antitumor activity of new ruthenium(ii) complexes of chloroquine. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 1122–1131, 2 fev. 2009.
- RAMAMOCHAN, L. *et al.* (E, E)-1, 2-Bis (2, 4, 6-trimethoxybenzylidene) hydrazine. **Asian J. Pure Appl. Chem.**, v. 1, p. 86, 1995.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 10 set. 2012.
- RASRAS, A. J. M. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of cholic acid hydrazone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2307–2313, 1 jun. 2010.
- RÄZ, B. *et al.* The Alamar blue® assay to determine drug sensitivity of African Trypanosomes (T.b. *Rhodesiense* and T.b. *Gambiense*) in Vitro. **Acta Tropica**, v. 68, n. 2, p. 139–147, 1 nov. 1997.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ROCHA, V. P. C. *et al.* Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1001–1010, 1 jul. 2013.
- ROMERO, A. H. *et al.* Design, synthesis, structure-activity relationship and mechanism of action studies of a series of 4-chloro-1-phthalazinyl hydrazones as a potent agent against *Leishmania Braziliensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 606–620, 15 fev. 2017.

- SALAS, P. F. *et al.* Structural characteristics of chloroquine-bridged ferrocenophane analogues of ferroquine may obviate malaria drug-resistance mechanisms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1596–1613, 28 fev. 2013.
- SCARIOT, D. B. *et al.* Induction of early autophagic process on *Leishmania Amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00255/full>>. Acesso em: 2 abr. 2020.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 18 jun. 2017.
- SERENO, D. *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2064–2069, jul. 2001.
- SHANKS, G. D. *et al.* Efficacy and safety of atovaquone/proguanil as suppressive prophylaxis for *Plasmodium Falciparum* malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 494–499, 1 set. 1998.
- SILVA, M. N. da; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. de. Um Panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, maio 2003.
- SILVA, T. F. D. *et al.* Novel orally active analgesic and anti-inflammatory cyclohexyl-N-acylhydrazone derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3067–3088, fev. 2015.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, maio 2004.
- SOARES, A. S. *et al.* Naphthoquinones of *Sinningia Reitzii* and anti-inflammatory/antinociceptive activities of 8-Hydroxydehydrodunnione. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1837–1843, 23 jun. 2017.
- SOUZA-SILVA, F. *et al.* Evidences for Leishmanicidal activity of the naphthoquinone derivative epoxy- α -lapachone. **Experimental Parasitology**, v. 147, p. 81–84, 1 dez. 2014.
- SUPURAN, C. *et al.* Carbonic anhydrase activators. Part 14. Syntheses of mono and bis pyridinium salt derivatives of 2-Amino-5-(2-Aminoethyl)- and 2-Amino-5-(3-Aminopropyl)-1,3,4-Thiadiazole and their interaction with isozyme II. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 597–606, 1 jan. 1996.
- SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How Were New Medicines Discovered? **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 10, n. 7, p. 507–519, 24 jun. 2011.
- TEIXEIRA, M. J. *et al.* In Vitro and in Vivo Leishmanicidal Activity of 2-Hydroxy-3-(3-Methyl-2-Butenyl)-1,4-Naphthoquinone (Lapachol). **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 44–48, 2001.

TEMRAZ, M. G. *et al.* Anti-Leishmanial click modifiable thiosemicarbazones: design, synthesis, biological evaluation and in silico studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 585–600, 10 maio 2018.

TENÓRIO, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, dez. 2005.

VARGAS, E. *et al.* Hydrazone derivatives enhance antileishmanial activity of Thiochroman-4-Ones. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 70, 29 dez. 2017.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* American Integumentary Leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.21877/2448-3877.201800722>>. Acesso em: 19 maio. 2020.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania Donovanii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 1 ago. 2004.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). v. 25, p. 411, 1911.

VOLPINI, Â. C. *et al.* PCR-RFLP to Identify *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *Amazonensis* causing American Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–37, mar. 2004.

VUKOVIC, N. *et al.* Substituted imino and amino derivatives of 4-Hydroxycoumarins as novel antioxidant, antibacterial and antifungal agents: synthesis and in vitro assessments. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1011–1018, 15 jun. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/q-a-detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 16 dez. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological situation**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9122/en/>. Acesso em: 21 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Situation and trends**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 10 fev. 2016.

XIE, S.-S. *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel tacrine–coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer’s disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 540–553, 1 jun. 2013.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent prestoblue in comparison with alamarblue and mtt to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1–7, jan. 2015.

YANG, D. M.; LIEW, F. Y. Effects of Qinghaosu (Artemisinin) and Its derivatives on experimental cutaneous Leishmaniasis. **Parasitology**, v. 106 (Pt 1), p. 7–11, jan. 1993.

ZAVERI, A. *et al.* Comparison of the mtt and alamar blue assay for in vitro anti cancer activity by testing of various chalcone and thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2013, p. 707–716, 1 abr. 2013.

ZHANG, X.-M. *et al.* Synthesis and evaluation of isatin- β -Thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant gram-positive bacterial species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 419–430, ago. 2015.

ZHENG, L.-W. *et al.* Synthesis of novel substituted pyrazole-5-Carbohydrazide Hydrazone derivatives and discovery of a potent apoptosis inducer in A549 lung cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 1957–1962, 1 mar. 2009.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 1 out. 2017.