



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de
Fármacos e Cosméticos

APOSTILA DO MINI-CURSO:

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS

César Armando Contreras
Elizandra Aparecida Britta
Fabianne Martins Ribeiro
Jean Henrique da Silva Rodrigues
Jessica Carreira de Paula

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Maringá
Julho - 2015

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Geral.....	6
2.2. Específicos.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1. Células.....	6
3.2. Ensaio antiproliferativo para avaliação da atividade antiprotozoário.....	7
3.3. Ensaio de citotoxicidade em células L929.....	9
3.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em <i>L. amazonensis</i>	10
3.5. Acúmulo de inclusões lipídicas em <i>L. amazonensis</i>	10
3.6. Ensaio de atividade contra bactérias.....	11
3.6.1. Padronização da suspensão de micro-organismos.....	11
3.6.2. Método de microdiluição em caldo (Concentração inibitória mínima).....	11
3.7. Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar (halo de inibição).....	12
4. REFERÊNCIAS.....	12

1. INTRODUÇÃO

O nascimento da quimioterapia antimicrobiana ocorreu há mais de 100 anos pelo bacteriologista alemão Paul Erlich. Entusiasmado com a eficácia dos compostos derivados do arsênico para o tratamento da doença do sono, ele convocou uma equipe para encontrar um composto que combatesse a sífilis (SEPKOWITZ, 2011). Seu sonho era encontrar uma substância que tivesse afinidade pelos patógenos sem afetar as células do hospedeiro, que foi nomeada por ele como “bala mágica”. Foram mais de 600 compostos sintetizados, até que o composto número 606 (arsfenamina – nome comercial: Salvarsan) se enquadrou neste quesito para a época (BOSCH & ROSICH, 2008).

A arsfenamina foi o composto de escolha para o tratamento da sífilis até a descoberta ao acaso da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Podemos dizer que foi Fleming que desenvolveu as técnicas *in vitro* para a descoberta de novos antimicrobianos (AMSTERDAM, 2005). Nota-se então que a corrida para a descoberta de novos antimicrobianos depende de muito trabalho e também de sorte, esta como disse Louis Pasteur só favorece a mente preparada.

Nosso laboratório vem se destacando como referência na prospecção de drogas que possuam atividade antimicrobiana, dentre os micro-organismos testados incluem bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), leveduras (*Candida albicans*) e protozoários (*Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*). O presente minicurso se propõe a apresentar as principais técnicas utilizadas no estudo de antimicrobianos, sendo o enfoque das metodologias no estudo de novos compostos com atividade anti-*Leishmania*.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis por causar as leishmanioses, que são predominantes em 88 países de 4 continentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses ameaçam aproximadamente 350 milhões de pessoas (WHO, 2001a) e estima-se que por ano ocorram 1,6 milhões de novos casos (WHO, 2001b).

As leishmanioses podem ser divididas em duas formas clínicas: tegumentar e visceral. Estas diferentes formas são manifestadas dependendo da espécie do protozoário e do sistema imunológico do hospedeiro. A leishmaniose tegumentar (LTA) acomete principalmente pele e mucosas, podendo ser dividida em cutânea localizada,

cutânea difusa e cutaneomucosa (CROFT & COOMBS, 2003; GENARO & REIS, 2005; NGURE et al., 2009). A leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar, é a forma mais grave. Nesta ocorre disseminação do protozoário por todo o sistema fagocítico mononuclear, podendo levar o paciente a óbito se o mesmo não for submetido ao tratamento específico (MICHALICK & GENARO, 2005).

O Ministério da Saúde registrou no período de 2000 a 2012, no Brasil, um total de 372.601 casos confirmados de leishmaniose, sendo 87,89% de LTA e 12,1% de LV. Dentre os casos de LV, houve 2.920 óbitos (Portal da Saúde).

Os dípteros dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya* da família Psychodidae são os vetores da leishmaniose. São insetos geralmente de pequeno porte, apresentam cerdas longas que cobrem o corpo e as patas. Possuem atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrangendo-se durante o dia em lugares húmidos, sombrios e protegidos do vento. Nesta família, apenas as fêmeas são hematófagas. São conhecidos popularmente como mosquito-palha ou birigui (DE CARVALHO & MORENO 2001; MURRAY et al., 2005; FIOCRUZ).

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) é composto por protozoários unicelulares, heteroxênicos, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*. De acordo com características fenotípicas, as espécies de *Leishmania* que infectam o homem podem ser divididas em subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 1987). As espécies *L. amazonensis* (*Leishmania*) e *L. braziliensis* (*Viannia*) são responsáveis pela leishmaniose cutânea e mucocutânea, respectivamente.

Durante o ciclo de vida, o parasito apresenta duas formas distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota apresenta flagelo livre, sendo encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota não possui flagelo livre, sendo encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado, principalmente nos macrófagos (MICHALICK, 1995).

O ciclo de vida deste parasito inicia-se durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do inseto inocula formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, que são rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais e se transformam em formas amastigotas intracelulares obrigatórias. Os protozoários estabelecem-se no fagolisossomo dos macrófagos, resistindo à ação destruidora das enzimas lisossomais, multiplica-se por fissão binária até romper a célula hospedeira. As amastigotas liberadas são novamente fagocitadas por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado,

onde formas amastigotas são adquiridas com o sangue e/ou linfa intersticial. No intestino do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, completando o ciclo biológico do protozoário (MICHALICK, 1995; GREVELINK & LERNER, 1996).

Embora sejam consideradas células eucarióticas, os protozoários do gênero *Leishmania*, apresentam características exclusivas do grupo dos tripanossomatídeos, como a presença de uma única mitocôndria, que se estende por todo o corpo celular, tendo uma porção diferenciada denominada de cinetoplasto, que possui um arranjo complexo de DNA, conhecido como DNA citoplástico (kDNA) (SOUZA et al., 1997; VANNIER-SANTOS et al, 2002; CAVALCANTI et al., 2008).

Outras organelas distintas dos mamíferos também são encontradas, como por exemplo, o glicossomo e o acidocalcissomo. O glicossomo é uma estrutura delimitada por membrana que contém enzimas responsáveis pelo metabolismo de açúcares (OPPERDOES & COOMBS, 2007). O acidocalcissomo é uma organela que armazena cálcio, e também, é rica em pirofosfato, magnésio, sódio e potássio (MIRANDA et al., 2000; MORENO & DOCAMPO, 2003). Possui várias funções, como manutenção do equilíbrio do pH intracelular e osmorregulação, devido a presença de bombas (Ca^{2+} -ATPase, V-H^{+} -ATPase, H^{+} -PPase) (DOCAMPO & MORENO, 2001; DOCAMPO & MORENO, 2008; MIRANDA et al., 2008).

Mesmo com todas essas características exclusivas destes protozoários, desde a década de 40 o tratamento contra a leishmaniose tem sido restrito a alguns medicamentos, como os derivados dos antimoniais pentavalentes, por exemplo, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina que são considerados fármacos de primeira escolha (CROFT & COOMBS, 2003). No entanto, estes medicamentos estão longe de serem ideais para o tratamento desta zoonose, pois não são ativos quando administrados oralmente, é necessário longo período de tratamento (CROFT, 1988), causam efeitos tóxicos e frequentemente encontram-se casos que apresentam resistência, e, portanto, outros agentes antiprotozoário precisam ser utilizados (BERMAN, 1996; GREVELINK & LERNER, 1996; BERMAN, 1997). Berman (1988) verificou em ensaios *in vitro* que o tratamento com antimoniais pentavalentes não mostrou efeito leishmanicida sobre formas promastigotas, concluindo que seu efeito se restringia apenas sobre formas amastigotas.

A pentamidina (GENARO & REIS, 1995; GREVELINK & LERNER, 1996) e a anfotericina B (SERENO et al, 2000), são considerados quimioterápicos de segunda escolha para o tratamento de pacientes com leishmaniose. O mecanismo de ação das

pentamidinas baseia-se na sua ligação ao DNA do cinetoplasto, causando danos ao protozoário (CROFT & COOMBS, 2003). Já o mecanismo da anfotericina B envolve os esteróis da membrana, resultando na perda da permeabilidade celular (SAHA *et al.*, 1986; COHEN, 1998). Como as drogas de primeira escolha, a pentamidina (BENNETT, 1996) e a anfotericina B (BERMAN, 1997) causam efeitos colaterais durante o tratamento. Assim, novos fármacos menos tóxicos e mais efetivos têm sido constantemente buscados para o tratamento desta patologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Proporcionar aos alunos conhecimentos sobre técnicas básicas utilizadas para investigar a atividade biológica e mecanismos de ação de substâncias naturais e sintéticas frente aos principais micro-organismos utilizados para a pesquisa de novas drogas.

2.2. Específicos

- Verificar uma possível atividade antimicrobiana do composto sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Verificar a citotoxicidade do composto sobre a linhagem de células de mamífero LLCMK₂;
- Determinar possíveis mecanismos de ação do composto através de técnicas de fluorímetro e microscopia de fluorescência em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Células

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) serão cultivadas em meio Warren (Infusão de Cérebro e Coração “Difco[®]”, hemina e

ácido fólico) pH 7,0 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco) e incubadas em estufa a 25 °C. Células epiteliais *LLCMK₂* serão cultivados em meio DMEM suplementado com 10 % SFB e mantidas em estufa a 34 °C e 5% de CO₂.

3.2. Ensaio antiproliferativo para avaliação da atividade antiprotozoário

O ensaio antiproliferativo é uma das etapas experimentais iniciais na busca de substâncias com atividade tripanocida. Como objetivo geral do experimento buscase determinar o valor de IC₅₀ para dada substância, ou seja, a concentração de droga na qual ocorra a inibição de 50% dos protozoários após 72 h de tratamento, quando comparado a um grupo controle.

- Pesar a droga utilizando tubos Eppendorf[®] estéreis (**1 mg para compostos isolados/sintéticos** e 10 mg para extratos e frações);
- Adicionar 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) ao eppendorf, agitar até completa dissolução da droga e completar com 900 µL de meio Warren (solução estoque (SE): 1000 µg/mL);
- Identificar 6 outros tubos eppendorf estéreis (Concentrações: **100, 50, 10, 5, 1 e 0,5 µg/mL**) para realizar a diluição da droga;
- Adicionar aos tubos identificados 500, 800, 500, 800, 500 e 800 µL de meio Warren, respectivamente;
- Homogeneizar e transferir 500 µL da solução estoque para o tubo 1 (C: 100 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 1 e transferir 200 µL deste para o tubo 2 (C: 50 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 2 e transferir 500 µL deste para o tubo 3 (C: 10 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 3 e transferir 200 µL deste para o tubo 4 (C: 5 µg/mL).
- Homogeneizar o tubo 4 e transferir 500 µL deste para o tubo 5 (C: 1 µg/mL).
- Homogeneizar o tubo 5 e transferir 200 µL deste para o tubo 6 (C: 0,5 µg/mL).

Padronização do inóculo

- Formas promastigotas de *L. amazonensis* serão previamente cultivados em meio Warren suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por 2 dias à 25°C;
- Homogeneizar a garrafa de cultura, retirar 20 µL e adicionar o volume a um eppendorf contendo 980 µL de formalina 3%;
- Contar as formas promastigotas presentes no quadrante central (região A) da Câmara de Neubauer (Fig. 1), obter a média dos dois campos de contagem, multiplicar pela diluição (50) e pelo fator de correção da câmara(10⁴), obtendo-se um número **X** de protozoários;

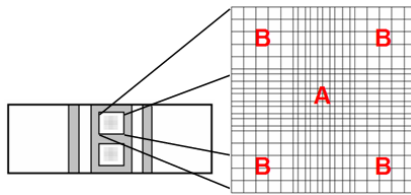


Figura 1. Hematímetro ou Câmara de Neubauer.

- O inóculo para a realização do ensaio antiproliferativo deve ser de 1x10⁶ parasitas/mL, sabendo que em 1 mL existe um número **X** de parasitos realiza-se uma regra de 3 para descobrir qual volume **V** é necessário utilizar para obter 1x10⁶ parasitos/mL;
- Como o experimento em geral é montado simultaneamente para duas drogas em uma placa de 24 poços, é preciso padronizar o volume real (VR) de inóculo a ser coletado para 25 mL (volume **V** x 25= VR).

Preparo do pool

- O pool deve ser preparado em um tubo falcon, sendo composto por 10% de SFB (2,5 mL), 10% da droga (2,5 mL distribuído diretamente nos poços), o volume de inóculo calculado e meio Warren em q.s.p. para 25 mL, além de 33,75 µL de gentamicina/estreptomicina.

Montagem e Leitura do experimento

- Transferir 100 µL de cada eppendorf contendo as drogas para dois poços (ensaio em duplicata) da placa, para os poços controle transferir 100 µL de Warren;
- Adicionar 900 µL do pool a cada poço, obtendo-se uma concentração final 10 vezes menor que a obtida no eppendorf;
- Homogeneizar a placa e incubar a 25 °C por 72 h;

- Após o tempo de ensaio realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

3.3. Ensaio de citotoxicidade em células LLCMK₂

O Ensaio de citotoxicidade é uma metodologia de ampla utilização que permite verificar a quão tóxica é uma substância para determinada célula. Em nosso caso usaremos células epiteliais do rim de *Macacca mulata* da linhagem LLCMK₂ como modelo.

Obtenção da monocamada de células

- Usar garrafas de cultura média com tapete de células fechado como fonte de inóculo;
- Retirar o meio de cultura DMEM das garrafas e lavar o tapete de células com PBS;
- Adicionar tripsina diluída em PBS por aproximadamente 30 segundos;
- Retirar a tripsina/PBS e visualizar no microscópio;
- Adicionar meio de cultura e reservar em gelo;
- Transferir 100 µL desta suspensão para um eppendorf contendo 900 µL de meio;
- Homogeneizar o conteúdo do eppendorf e proceder a contagem em Câmara de Neubauer (Fig 1), contando apenas as células presentes nos quatro quadrantes laterais (regiões B) de cada campo, dividindo o número total contado por quatro obtendo uma média;
- Multiplicar a média pelo fator de correção da câmara (10^4) e pela diluição (10);
- Proceder aos cálculos tal como no ensaio antiproliferativo, sabendo que para o experimento de citotoxicidade é ideal um inóculo de $2,5 \times 10^5$ células;
- Preparar o pool contendo o volume de inóculo calculado, 10% de SFB, meio de cultura em q.s.p. 10 mL e 12,5 µL de gentamicina;
- Distribuir 100 µL da suspensão homogeneizada em cada poço, deixando três poços vazios para usá-los como branco;
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

Tratamento das células

- Pesar e diluir as drogas em DMSO tal como no ensaio antiproliferativo;
- Preparar as diluições em eppendorf, utilizando meio de cultura com gentamicina, visando obter concentrações finais de 500, 100, 50, 10, 1 e 0,5 µg/mL;
- Após a formação da monocamada de células retirar o meio de cultura dos poços e transferir 100 µL de cada eppendorf para os respectivos poços (ensaio em triplicata);
- Manter pelo menos 3 poços da placa sem a adição da droga (controle);
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 72 h.

Leitura do experimento

- Após o tempo de incubação retirar o meio de cultura, lavar cada poço com 100 µL de PBS, retirar o PBS e adicionar 50 µL de MTT;
- Incubar na estufa por 4 h;
- Após incubação, retirar o MTT e adicionar 150 µL de DMSO;
- Realizar a leitura em leitor de ELISA a 570 nm.

3.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *L. amazonensis*

Procedimentos:

- Após tratamento com o composto por 24 h, lavar 2x as células em PBS (3000 rpm por 5 min.);
- Ressuspender em 497,5 µL de PBS e 2,5 µL de H₂DCFDA (5 µg/mL);
- Incubar a temperatura do protozoário por 45 minutos no escuro;
- Adicionar em placa preta de 96 poços 100 µL de cada amostra e realizar leitura em fluorímetro;

3.5. Acumulo de inclusões lipídicas em *L. amazonensis*

Procedimentos:

- Após tratamento com o composto por 24 h, lavar 2x as células em PBS (3.000 rpm por 5 min.);
- Ressuspender em 495 µL de PBS e 5 µL de Nile Red (10 µg/mL em DMSO);

- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro;
- Adicionar em placa preta de 96 poços 100 µL de cada amostra e realizar leitura em fluorímetro e capturar as imagens em microscópio de fluorescência.

3.6. Ensaio de atividade contra bactérias

A atividade antibacteriana dos compostos será avaliada contra o bacilo Gram negativo *Escherichia coli* ATCC 25922 e o coco Gram positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pelos métodos de microdiluição em caldo e disco difusão em ágar;

3.6.1. Padronização da suspensão de micro-organismos

As suspensões microbianas serão padronizadas de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). As bactérias serão cultivadas em caldo Muller-Hinton (MHB) durante 18-24 h. Após o crescimento, a suspensão microbiana será padronizada em solução salina estéril a uma turbidez equivalente a 0,5 escala de McFarland (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC / mL).

3.6.2. Método de microdiluição em caldo (Concentração inibitória mínima)

Uma solução de 2mg/ml do composto será preparada usando caldo Müller-Hinton e DMSO solvente. Cem microlitros de caldo Müller-Hinton serão adicionados a cada poço da placa de 96 poços. Um volume de 100 µl da solução do composto será adicionado aos poços da primeira linha e, em seguida uma diluição em série será realizada, resultando em concentrações que variam de 3,9 µg / mL a 1000 µg / ml. Na décima, décima primeira e décima segunda linhas serão utilizadas como controle de inóculo, droga, e os controles de meio de cultura, respectivamente. Subsequentemente, 5 µl da suspensão de microrganismos previamente padronizada será adicionado a todos os poços, e a placa será incubada a 37 ° C por 24h. A concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) será indicada pela ausência de turvação no meio de cultura.

3.7. Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar (halo de inibição)

Será utilizado um swab de algodão estéril e este será mergulhado na suspensão de bactérias após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab deve ser girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isso ajudará a retirar qualquer excesso de inóculo no swab. As bactérias serão inoculadas na superfície da placa de ágar Müller-Hinton esfregando o swab em toda a sua superfície. Repete-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo por toda a placa. Como passo final, passa-se um swab na margem da placa de ágar.

Os compostos em teste serão colocados num poço feito com um cilindro de metal na placa de Agar já semeada e em seguida elas serão colocadas na estufa, a 37° C, por 24 h. Após a incubação examina-se cada placa, verificando se foi observada a inibição ou crescimento das bactérias nas regiões próximas a amostra, mediante a formação ou não de halos de inibição. O halo de inibição será considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.

4. REFERÊNCIAS

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: **Antibiotics in laboratory medicine**, ed Lorian V. (Williams & Wilkins, Baltimore, Md), 5th ed., 2005, p. 61.

BOSCH, F., ROSICH, L. The contributions of paul ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. **Pharmacology**, 82(3):171-9, 2008.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paul.**, 6: 93-100, 1964.

CAMPOS, V., STRABELLI, T.M., AMATO NETO, V., SILVA, C.P., BACAL, F., BOCCHI, E.A., STOLF, N.A. – Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **Journal of Heart Lung Transplant.**, **27**: 597-602, 2008.

CANÇADO, J.R. - Tratamento específico. In *Cardiopatía Chagásica*, (Cançado, J. R. & Chuster, M., Eds). Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte; 327-55, 1985. In ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA, M.E.S., BRENER, Z. – A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **45**: 819-824, 2000.

CARLIER, Y. – Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. **Bull. Acad. R. Med. Belg.**, **162**: 409-416, 2007.

COURA, J.R. ,VIÑAS, P.A. – Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, **465**: S6-S7, 2010.

COURA, J.R., CASTRO, S.L. – A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97** (1): 3-24, 2002.

DANTAS, A.P., SALOMÃO, K., BARBOSA, H.S., CASTRO, S.L. – The effect of *Bulgarian propolis* against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101**: 207-211, 2006.

GALVÃO, L.M., NUNES, R.M., CANÇADO, J.R., BRENER, Z., KRETTLI, A.U. - Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** , **87**: 220–3, 1993. In ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA, M.E.S., BRENER, Z. – A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **45**: 819-824, 2000.

HERWALDT, B.L. – Laboratory-acquired infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, **14**(4): 659-668, 2001.

Ministério da Saúde, 2010a, acessado em 18/12/2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_brasil_2005_a_2010.pdf.

NEVES, D.P. – **Parasitologia Humana**. Livraria Atheneu. 11ªEd., 2005.

NIELMANN, A.; TAKATSUKI, A.; ELSÄSSER, H. P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. **J. Histochem. Cytochem.**, **48 (2)**: 251-258, 2001.

PINTO DIAS, J.C. – Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, **23 Sup. 1**: S13-S22, 2007.

PINTO DIAS, J.C. – The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Ann. Intern. Med.** **144**: 772-774, 2006.

PRATA, A. – Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, **1**: 91-100, 2001.

RASSI JÚNIOR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. – Chagas disease. **Lancet**, **375**: 1388-402, 2010.

SEPKOWITZ, K.A. One hundred years of Salvarsan. **N Engl J Med.** **365(4)**:291-3, 2011.

SILVA JÚNIOR, E.N., DE SOUZA, M.C.B.V., FERNANDES, M.C., MENNA-BARRETO, R.F.S., PINTO, M.C.F.R., LOPES, F.A., DE SIMONE, C.A., ANDRADE, C.K.Z., PINTO, A.V., FERREIRA, V.F., DE CASTRO, S.L. – Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **16**: 5030-5038, 2008.

SILVA JÚNIOR, E.N., GUIMARÃES, T.T., MENNA-BARRETO, R.F.S., PINTO, M.C.F.R., SIMONE, C.A., PESSOA, C., CAVALCANTI, B.C., SABINO, J.R., ANDRADE, C.K.Z., GOULART, M.O.F., DE CASTRO, S.L., PINTO, A.V. - The

evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-beta-lapachone derivatives and beta-lapachone-based 1,2,3-triazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **18**: 3224-3230, 2010.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.

TONIN, L.T.D., PANICE, M.R., NAKAMURA, C.V., ROCHA, K.J.P., DOS SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DA COSTA, W.F., SARRAGIOTTO, M.H. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carbonile)-3-carboxamides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **64**: 386-389, 2010.