



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MATERIAL
ORGÂNICO DERIVADO DA BASE DE SCHIFF N,N-
BIS’(SALICILIDENO)-1,2-FENILENODIAMINA COMPLEXADO COM
COBRE (II) E COBALTO (II)”**

Bianca Soriano

Tese do Exame Geral de Defesa de
Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – processo 88882.426509/2019-01

**São Carlos - SP
2021**

Bianca Soriano

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MATERIAL ORGÂNICO
DERIVADO DA BASE DE SCHIFF N,N- BIS'(SALICILIDENO)-1,2-
FENILENODIAMINA COMPLEXADO COM COBRE (II) E COBALTO (II)**

Tese do Exame de Defesa de
Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal de São
Carlos.

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Universidade Federal de São Carlos

Dra. Patrícia Brassolatti
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Marlon Ivan Valério Cuadros
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Adriano Evandir Marchello
Unisagrado/Universidade Estadual Paulista

São Carlos
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Bianca Soriano, realizada em 08/11/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Profa. Dra. Patricia Brassolatti (UFSCar)

Prof. Dr. Marlon Ivan Valerio Cuadros (UEM)

Prof. Dr. Adriano Evandir Marchello (Êxito)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Resumo

O tratamento para as infecções bacterianas é feito através de antimicrobianos e a resistência é um grande problema mundial que leva a aproximadamente 35.000 mortes por ano. Outro problema de saúde pública está relacionado as infecções ocasionadas por parasitas como a leishmaniose visceral que apresenta manifestações clínicas graves podendo levar a óbito e os tratamentos disponíveis podem ocasionar efeitos colaterais significativos além de resistência. Em vista deste contexto há necessidade de produção de novas substancias para o desenvolvimento farmacológico de moléculas e seus derivados. Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físicas e biológicas dos derivados orgânicos da base de Schiff N,N'-bis(Salicilideno)-1,2-fenilenodiamina complexada com cobre (II) e cobalto (II). Foram utilizadas técnicas de difração de raios X, espectroscopia Ramam, Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), *time kill*, modulação de antibióticos com amicacina e gentamicina, determinação da atividade leishmanicida, determinação da citotoxicidade celular em fibroblastos, avaliação da produção de Espécies Reativas de oxigênio (EROs) e migração celular. Foi possível detectar diferenças estruturais entre o ligante livre e seus complexos. Na atividade antimicrobiana, os resultados mais expressivos foram obtidos com as Gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *M. luteus*, *E. faecalis* e *B. subtilis* com inibições entre 75 e 96% para todas as concentrações testadas e uma CIM de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para estas bactérias. A CBM obtida foi de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente. Para *S. saprophyticus* e *E. faecalis* detectou-se 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Através do teste de modulação de antibióticos detectou-se efeito sinérgico do ligante livre com os antibióticos gentamicina e amicacina diminuindo 4 e 16X a CIM. Na avaliação da atividade leishmanicida observou-se atividade nas maiores concentrações testadas dos complexos com inibições acima de 85%. A avaliação de citotoxicidade permitiu observar que o ligante livre apresenta menor toxicidade para todos os tipos celulares testados quando comparado aos complexos. Atraves do teste de ROS, detectou-se produção de EROs, porem na menor concentração testada, esta produção atingiu níveis próximos aos níveis do grupo controle. Atraves do teste de migração celular, detectou-se o crescimento total

das células em 48 horas com o ligante livre e 72 horas com o complexo de cobalto. Sendo assim, os dados sugerem que o complexo de cobalto e o ligante livre apresentam atividade antimicrobiana e leishmanicida expressiva quando comparado com o complexo de cobre.

Palavras chaves: atividade antimicrobiana, atividade leishmanicida, base de Schiff, complexos metálicos.

Abstract

Treatment for bacterial infections is through antimicrobials and resistance is a major worldwide problem that leads to approximately 35,000 deaths per year. Another public health problem is related to occurrences caused by parasites such as visceral leishmaniasis, which presents severe clinical manifestations that can lead to death and the available treatments can cause definite side effects in addition to resistance. In this way, there is a need to produce new substances for the pharmacological development of molecules and their derivatives. This study aimed to evaluate the physical and biological properties of products derived from the base of Schiff N, N'-bis (Salicylidene) -1,2-phenylenediamine complexed with copper (II) and cobalt (II). X-ray diffraction techniques, Ramam spectroscopy, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CBM), time kill, modulation of antibiotics with amikacin and gentamicin, determination of leishmanicida, determination of cell cytotoxicity in fibroblasts and evaluation of production of Reactive Oxygen Species (ROS). It was possible to identify differences between the free ligand and its criteria. In the antimicrobial activity, the most expressive results were obtained with the Gram-positives *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *M. luteus*, *E. faecalis* and *B. subtilis* with inhibitions between 75 and 96% for all tested and a MIC of 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ to these bacteria. The CBM obtained was 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ to *S. aureus* and *S. epidermidis*, respectively. To *S. saprophyticus* and *E. faecalis*, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ was detected. Through the antibiotic modulation test, a synergistic effect of the free ligand with the antibiotics gentamicin and amikacin was detected, reducing the MIC by 4 and 16X. In the evaluation of the leishmanicidal activity, activity was observed in the highest tested concentration of the studies with inhibitions above 85%. The assessment of cytotoxicity allowed us to observe that the free ligand has lower toxicity for all cell types tested when compared to the complexes. Through the ROS test, ROS production was detected, but at the lowest concentration tested, this production reached levels close to the levels of the control group. Through the cell migration test, total cell growth was detected in 48 hours with the free ligand and 72 hours with the cobalt complex. Thus, the data suggest that the cobalt complex and the free ligand have expressive antimicrobial and leishmanicidal activity when compared to the copper complex.

Key words: antimicrobial activity, leishmanicidal activity, Schiff's base, metal complexes.

Índice de Figuras

Figura 1: Fotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de <i>Leishmania infantum chagasi</i> nas formas amastigota (A) e promastigota (B) (fotos de Márcio Sobreira e Vanessa Freitas - Fiocruz - MG, CPqRR). Adaptado de: PIMENTA, FREITAS, SECUNDINO 2012.....	15
Figura 2 Síntese da salofen (III), $C_20H_{16}N_2O_2$, a partir da reação com 1,2 fenilenodiamina (I) e salicilaldeído (II).....	26
Figura 3 Fórmula geral da base de Schiff Salofen complexada com cobre (II) e cobalto (II), onde M representa Cu e Co.....	27
Figura 4. Aspecto da salofen complexada com A) cobre (II) e B) cobalto (II). Fonte: Arquivo pessoal.....	27
Figura 5: Mapa da placa de 96 poços utilizado para todas as cepas bacterianas nos testes de microdiluição realizados no Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas. Coluna 6: poços vazios.....	31
Figura 6. Difração de raios x do ligante livre da base de Schiff salofen e seus complexos metálicos Co (II) e Cu (II).....	38
Figura 7 Espectro Raman do ligante livre Salofen e seus complexos com Co(II) e Cu(II).....	40
Figura 8 espectro Ramam do complexo de cobalto pré e pós esterilização por autoclave.....	41
Figura 9. Porcentagem de inibição bacteriana após 24 horas de exposição ao complexo de cobalto. A) <i>S. aureus</i> , B) <i>S. epidermidis</i> , C) <i>S. saprophyticus</i> , D) <i>E. faecalis</i> , E) <i>M. luteus</i> e F) <i>B. subtilis</i> . * $P < 0,05$ vs Pen/Estrep.....	44
Figura 10. Placas demonstrando a CBM sendo A) <i>S. aureus</i> , B) <i>S. epidermidis</i> , C) <i>S. saprophyticus</i> , D) <i>M. luteus</i> , E) <i>E. faecalis</i> , F) <i>B. subtilis</i>	45
Figura 11 Ensaio Time Kill do ligante livre Salofen frente a <i>S. aureus</i> (ATCC 8095) em 24 horas. Os experimentos são expressos como a média e o desvio padrão de três amostras independentes.....	46
Figura 12. Ensaio Time Kill de complexo de cobalto frente a <i>S. aureus</i> (ATCC 8095) em 24 horas. Os experimentos são expressos como a média e o desvio padrão de três amostras independentes.	47

Figura 13. Ensaio <i>Time Kill</i> de complexo de cobalto frente a A) <i>E. faecalis</i> . B) <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) e C) <i>S. epidermidis</i> em 24 horas.	48
Figura 14. Morte celular após 24 e 48 horas de exposição dos complexos de cobalto e cobre sobre <i>L. infantum chagasi</i> , sendo A) Complexo de cobalto e B) Complexo de cobre. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. * P<0,05 vs (250 µg); # P<0,05 vs (125 µg).....	49
Figura 15. Viabilidade celular de HFF-1 (fibroblastos) após exposição ao ligante livre e seus complexos em 24, 48 e 72 horas, sendo A) dados apresentados como média ± desvio padrão. * P<0,05 vs 24h (1000 µg); • P<0,05 vs 24h (500 µg); □ P<0,05 vs 24h (500 µg); ○ P<0,05 vs 48h (500 µg); + P<0,05 vs 24h (250 µg); x P<0,05 vs 24h (250 µg); ● P<0,05 vs 48h (250 µg); ① P<0,05 vs 24h (125 µg); ¨ P<0,05 vs 48h (62,5 µg). B) Dados apresentados como média ± desvio padrão. * P<0,05 vs 24h (500 µg); ★ P<0,05 vs 48h (250 µg); • P<0,05 vs 48h (125 µg); ▫ P<0,05 vs 48h (62,5 µg); ♦ P<0,05 vs 24h (62,5 µg). C) Dados apresentados como média ± desvio padrão. * P<0,05 vs 24h (250 µg); • P<0,05 vs 24h (125 µg); ▫ P<0,05 vs 24h (62,5 µg).....	51
Figura 16. Viabilidade celular de HDFn (fibroblastos) após exposição ao ligante livre em 24, 48 e 72 horas, sendo A) dados apresentados como média ± desvio padrão.....	52
Figura 17 Viabilidade celular de HaCat (queratinócitos) após exposição ao ligante livre em 24, 48 e 72 horas, sendo A) dados apresentados como média ± desvio padrão	53
Figura 18. Microscopia óptica da ação do ligante livre sobre fibroblastos (HDF-1) em objetiva de 40X sendo A) controle de crescimento, B) concentração de 62,5 µg.mL ⁻¹ , C) concentração de 125 µg.mL ⁻¹ e D) concentração de 250 µg.mL ⁻¹	54
Figura 19 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) através da sonda DCFH-DA para queratinócito (HaCaT) após exposição de 72 horas aos compostos, sendo: A) Exposição ao complexo de cobalto e B) Exposição ao ligante livre Salofen. Controle negativo (C-) (células + meio de cultura); Controle Pósitivo (C+) (Células + 1µm de H2O2). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes. A análise foi realizada pelo teste paramétrico One way ANOVA e pós-teste de Dunnett's. O símbolo **** p < 0,0001	

representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos expostos aos compostos quando corupo C	55
Figura 20 Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao ligante livre salofen em diferentes concentrações	56
Figura 21 Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCaT frente ao complexo de Co em diferentes concentrações.....	57
Figura 22 Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HDFn frente ao ligante	58

Índice de Tabelas

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos complexos de cobre (II) e cobalto (II) contra bactérias patogênicas.....	42
Tabela 2 Atividade antimicrobiana do ligante livre Salofen contra bactérias patogênicas	42
Tabela 3 Atividade antimicrobiana dos complexos de cobre (II) e cobalto (II) contra bactérias patogênicas (LaMiB).	43

Sumário

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Infecções microbianas	7
2.2 Resistencia microbiana.....	10
2.3 Leishmaniose.....	14
2.3.1 Leishmaniose Visceral.....	16
2.4 Toxicidade Celular.....	17
2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	19
2.5 Bases de Schiff	20
2.5.1 Espectroscopia Ramam.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Caracterização das moléculas	26
4.2 Difração de raios X.....	27
4.3 Espectro Ramam	28
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana	28
4.4.1 Microrganismos	28
4.4.2 Padronização do inóculo bacteriano	29
4.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima	29
4.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima	32
4.4.5 Curva de sobrevivência (<i>Time Kill</i>).....	32
4.5 Modulação da atividade de antibióticos	33
4.6 Determinação da atividade leishmanicida.....	33

4.7	Determinação da citotoxicidade	34
4.7.1	Linhagem.....	34
4.7.2	Meio de cultivo	35
4.7.3	Cultura celular.....	35
4.7.4	Teste de proliferação celular	36
4.7.5	Avaliação intracelular da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	36
4.7.6	Migração celular.....	37
4.8	Análise estatística.....	37
5.	RESULTADOS.....	38
5.1	Difração de raios x.....	38
5.2	Espectro Ramam.....	39
5.3	Determinação da atividade antimicrobiana.....	41
5.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (Laboratório de Biotecnologia Microbiana).	41
5.3.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (LaMiB).....	43
5.3.3	Determinação da Concentração Bactericida mínima (LaMiB).....	44
5.3.5	Modulação da atividade de antibióticos	48
5.4	Determinação da Atividade Leishmanicida	49
5.5	Determinação da Citotoxicidade.....	50
5.6	Avaliação intracelular da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).	54
5.7	Migração celular	55
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

No século passado, doenças infecciosas atingiam e matavam metade da população por doenças microbianas. A partir daí, houve melhoria de procedimentos de higiene, tratamentos adequados para doenças infecciosas e prevenção vacinal. Ao observar as regiões mais pobres do planeta, onde estes itens citados não são utilizados adequadamente até hoje, a taxa de mortalidade é alta (ROSER, RITCHIE, DADONAITE 2019). Aliado a isso, as infecções microbianas ainda são responsáveis por índices elevados de mortalidade e morbidade em humanos e animais (DUBREUIL, 2020).

A microbiota do corpo humano é constituída por microrganismos e entre eles alguns são potenciais causadores de doenças que podem ser adquiridas tanto na comunidade como em ambiente hospitalar, esta última denominada de infecções nosocomiais, causando um alto índice de mortalidade e morbidade (LIU, DICKTER 2020). Este tipo de infecção pode ser adquirida enquanto outra doença é tratada ou por procedimentos inadequados realizados pelos profissionais da saúde (SERAFIM, 2013; HAQUE, et al 2018). Estas e outras razões fazem necessário o uso de antibióticos.

Dentre as bactérias de importância clínica, pode-se destacar o gênero *Staphylococcus*, bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e fossas nasais de pessoas saudáveis (FRANKLIN, LOWY 1998). No entanto, podem ocasionar infecções simples como furúnculos, até infecções graves como pneumonia. O emprego das sulfonamidas no início de 1930, tinha por objetivo dar fim as doenças infecciosas, porem no final da década foram detectadas as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes aquele tratamento (SANTOS, et al 2007). Devido a isso os estudos com antimicrobianos aumentaram com o passar dos anos.

Outro problema são as parasitoses pois, também são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade e infectam milhões de pessoas destacando-

se países em desenvolvimento, dentre elas está a leishmaniose visceral (GHORBANI, FARHOUDI 2018).

Esta doença é transmitida por fêmeas de flebotomíneos infectadas. Esta espécie é popularmente conhecida como "mosquito-palha", "tatuquira", entre outros e são insetos pequenos de coloração amarelada (MAROLI, 2012). A leishmania é um parasita obrigatoriamente intracelular que causa leishmaniose. Dentre os diversos tipos de leishmaniose, a visceral ocasiona um grande problema de saúde pública atingindo mais de 98 países ((AKHOUNDI et al, 2017; WILHELM, 2019). Em 2017 foram reportados 400.000 novos casos de leishmaniose visceral no mundo (OPAS, 2018).

Devido a ampla distribuição geográfica, manifestações clínicas graves, poucas opções de tratamento disponíveis com efeitos colaterais significativos como por exemplo artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, dor abdominal, cefaleia, insônia, edema, insuficiência renal, dentre outros, há uma necessidade de mais estudos voltados a busca de novas moléculas e derivados com relevância antiparasitária (DUARTE et al, 2016; FEIJÓ et al, 2016; MARAN et al, 2016).

Somado a isso o uso indiscriminado e inadequado de antibióticos provoca a resistência microbiana (MWANGI et al, 2019). Esta resistência pode ocorrer dentro de um ano em pelo menos uma espécie bacteriana e a ocorrência da resistência de um microrganismo a vários tipos de antibióticos ocorrem de maneira mais rápida que o desenvolvimento de novas classes de antibióticos (HU, Y. et al, 2010; MALAPASS et al, 2013).

Em vista do cenário atual, estudos vem sendo realizados com derivados de bases de Schiff e seus complexos metálicos relacionados as suas propriedades físicas, químicas e biológicas com uma variabilidade extensa de aplicações em diversos tipos de industrias. O derivado de base de Schiff testado no presente estudo é N,N'-bis(salilcilideno)-1,2-fenilenodiamina, também conhecido por Salofen (fórmula química $C_{20}H_{16}N_2O_2$) complexada com cobre (II) e cobalto (II). As buscas na literatura demonstram estudos relevantes com estes materiais relacionados as suas propriedades estruturais, microestruturais, vibracionais, ópticas e térmicas, porém não há estudos deste derivado específico complexado com metais e suas aplicações biológicas. (TOLEDO et al, 2015).

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo, comparar a estrutura física do ligante livre da base de Schiff e seus complexos metálicos e avaliar a ação antimicrobiana, leishmanicida e citotóxica da base de Schiff complexada com cobre (II) e cobalto (II).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecções microbianas

Os agentes microbianos determinaram de várias maneiras a evolução da espécie humana. Primeiramente bactérias, fungos, vírus e arqueias tornaram-se parte de nós, formando a microbiota (SENDER, FUCHS, MILO 2016). Um estudo atual definiu com maior precisão o número de bactérias presentes no nosso organismo que é de 39 trilhões de células e podemos considerar que os micróbios realizam muitas tarefas em troca de matéria prima e do abrigo que o hospedeiro oferece (TAGLIABUE, RAPPUOLI 2018).

Doenças infecciosas costumavam matar 50% da população antes dos 20 anos por doenças virais como varíola, raiva, sarampo e infecções bacterianas como difteria, tétano, febre tifoide e cólera (TAGLIABUE, RAPPUOLI 2018). Com o avanço da ciência, as estatísticas melhoraram significativamente e este resultado foi alcançado pela melhoria em higiene, mas também pelo tratamento de doenças infecciosas com antibióticos e pela prevenção com vacinas. Como prova, pode-se observar as áreas pobres do planeta, onde higiene, vacinação e antibioticoterapia não são usados adequadamente até hoje e como consequência a taxa de mortalidade por infecções nestas regiões são muito altas (ROSER, RITCHIE, DADONAITE 2019).

As infecções microbianas ainda são responsáveis por uma alta taxa de mortalidade e morbidade em humanos e animais (DUBREUIL, 2020). O potencial patogênico de uma bactéria está relacionado a capacidade dela em causar uma doença. Então são organizados três grupos, onde o primeiro é o potencial patogênico da cepa isolada de paciente, o microrganismo é primário e são os prováveis agentes da doença. O segundo grupo estão os patógenos oportunistas, que são isolados de pacientes imunocomprometidos e possivelmente são os agentes causadores da doença. E o terceiro grupo, onde estão presentes os microrganismos não patogênicos pois raramente ou nunca causam doença. No entanto o efeito de radiação, quimioterapia, entre outros,

pode alterar a capacidade de patogenicidade e bactérias consideradas não patogênicas podem passar a causar doenças. (BARON, 1996; PEREIRA, 2015).

As infecções hospitalares ou infecções nosocomiais, podem ser adquiridas enquanto outra doença é tratada ou por procedimentos inadequados feitos pelo profissional da saúde no ambiente hospitalar (SERAFIM, 2013; HAQUE, et al 2018)

Muitos patógenos podem estar envolvidos neste tipo de infecção, como bactérias, fungos, vírus e protozoários, porém o grupo principal são as bactérias causadoras de infecções oportunistas (MARAGON, 2019). As infecções podem ser derivadas de fontes exógenas ou endógenas e são transferidas por contato direto ou indireto entre pacientes, profissionais da saúde, objetos contaminados, visitantes ou mesmo fontes ambientais. Alguns relatórios feitos a partir de estudos de vigilância hospitalar e da Sociedade de Doenças Infecciosas da América denominaram um grupo de patógenos nosocomiais como patógenos ESKAPE (SANTAJIT, INDRAWATTANA 2016).

ESKAPE é uma sigla que engloba um grupo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*. Estas, são comuns causadoras de infecções nosocomiais envolvendo risco de vida ao paciente (SANTAJIT, INDRAWATTANA 2016).

O *S. aureus* é um patógeno oportunista Gram-positivo que está presente em 30-50% da população. Pode causar bacteremias, endocardite, osteomielite, meningite, pneumonia, infecções de pele e tecidos moles. Este microrganismo adquiriu vários mecanismos para evitar a resposta imune do hospedeiro e resistir aos antibióticos devido a atividade metabólica baixa (RÖHRIG, et al 2020).

O *S. saprophyticus* é uma bactéria Gram-positiva e coagulase negativa sendo o segundo microrganismo causador mais frequente em infecções agudas do trato urinário em mulheres jovens entre 16-25 anos e sexualmente ativas. O trato gastrointestinal é um dos principais reservatórios deste microrganismo. (NISHIMURA, MATSUYAMA, YAMAMOTO, 2020).

O *S. epidermidis* está predominantemente presente na pele. Assim como as demais do gênero, também é um contaminante nosocomial significativo, principalmente envolvendo dispositivos protéticos. Ainda é pouco conhecido o

mecanismo de patogênese desta bactéria e o tratamento ideal, por isso a decisão do tratamento clínico é baseada em estudos com *S. aureus* (LEE, et al 2018).

Outra família envolvida em infecções nosocomiais é a Enterococcaceae. Desta, destaca-se a bactéria *Enterococcus faecalis* que é um coco Gram-positivo e normalmente está presente na cavidade oral, trato gastrointestinal e vagina pois estes ambientes fornecem bons nutrientes e possuem níveis baixos de oxigênio (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020). Este microrganismo está envolvido em contaminações secundárias devido a falha no tratamento endodôntico com prevalência chegando a 90%. Pode acarretar infecções nos imunocomprometidos, como bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, de feridas, meningites e endocardites (CAMPOS, et al 2013).

O *Micrococcus luteus* pertence à família das Micrococcaceae. É uma bactéria Gram-positiva encontrada em solo, poeira, água, ar, produtos lácteos, cerveja, além de estar presente na microbiota da pele e mucosas. Apesar de não causar doença infecciosa, é considerada um contaminante nosocomial e pode acometer principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido (SENA, 2014).

Bacillus subtilis é um bacilo Gram-positivo produtor de esporos e é bem caracterizada, ou seja, existe uma variedade de ferramentas genéticas para sua manipulação. É considerada uma bactéria não patogênica (SOUZA, 2014).

Outro microrganismo que está presente na microbiota humana, mas pode tornar-se patogênico é a *Escherichia coli*. É uma bactéria Gram-negativa relacionada a infecções intestinais e extra intestinais. É uma bactéria de interesse internacional e está envolvida em infecções comuns em diferentes comunidades, podendo ser transmitida via hospitalar ou cadeia alimentar (ALVES et al., 2017; DUBREUIL, 2020).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista Gram-negativo envolvida em muitas infecções agudas e crônicas em pacientes com fibrose cística, pessoas imunocomprometidas, vítimas de queimaduras e pacientes ventilados mecanicamente. É um microrganismo que utiliza de vários mecanismos para sua proteção contra antibióticos, como, por exemplo, a formação de biofilmes (WANG, et al 2020).

A *Salmonella* spp. é um dos principais microrganismos envolvido na morbimortalidade em humanos e animais. Mundialmente, no período de um ano ocorrem 93,8 milhões de casos de salmonelose e 155.000 acabam em morte. O uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro acarreta em muitos perfis de resistência para este patógeno (WANG, et al 2020).

Uma espécie pertencente à família Enterobacteriaceae é a bactéria Gram-negativa *Citrobacter freundii*, sendo encontrada na água, solo, e intestino de humanos e animais acarretando várias infecções oportunistas, tanto superficiais como envolvendo risco de vida, podendo causar infecções do trato urinário, feridas, tecidos moles, meninges, trato respiratório e corrente sanguínea (YAP, et al 2020).

A capacidade destes microrganismos de causar doenças é denominado patogenicidade. Eles distinguem-se pelo fato de possuírem genes que codificam fatores de virulência, favorecendo a colonização e o estabelecimento de doença no hospedeiro. Como consequência, o aparecimento de sinais e sintomas anormais definirão o estado de doença (VIEIRA, 2009).

2.2 Resistencia microbiana

Medicamentos antimicrobianos são ativos contra uma variedade de infecções. Dentre eles temos os antibióticos, os antivirais, os antifúngicos e os antiparasitários. A resistência microbiana ocorre quando os microrganismos causadores de infecções sobrevivem a exposição a um medicamento que age matando ou inibindo seu crescimento. Isso permite que estas cepas capazes de sobreviver ao medicamento cresçam e se espalhem devido à falta de concorrência com outras cepas (O'NEILL, 2016).

A resistência a antibióticos é um grande problema mundial e leva a aproximadamente 35.000 mortes por ano. Anteriormente *S. aureus* resistente à meticilina e *Clostridium difficile* eram as mais preocupantes quando se falava sobre o tema resistência, porém bactérias Gram-negativas resistentes estão se desenvolvendo cada vez mais em todo o mundo.

Em 2013, o *Centers for Disease Control* (CDC) desenvolveu uma lista, que foi atualizada em 2019 sobre "ameaças urgentes" onde demonstram que é

necessária uma ação rápida e imediata para prevenção e tratamento. As bactérias Gram negativas, incluídas nesta lista foram *Enterobacteria* resistente à carbapenem e *Neisseria gonorrhoeae* resistente à cefalosporina, *Acinetobacter* multirresistente (MDR), *Enterobacteria* produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), *P. aeruginosa* MDR, *Salmonela* e *Shigella* resistentes (CDC, 2019; MORRIS, CERCEO, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) está comprometida a desenvolver uma abordagem global de monitoramento da resistência microbiana com medidas predefinidas importantes e resultados consistentes com o Plano e Ação Global (GAP). O Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana fornece dados para avaliar a disseminação de resistência, informando e monitorando o impacto de estratégias locais, nacionais e globais (AKINSOLU, et al 2019).

A principal via de exposição de um ser humano a patógenos resistentes é através do contato direto com outra pessoa ou contato indireto. São as mesmas vias de transmissão típicas de patógenos em geral e as vias de impedimento da circulação dos patógenos resistentes também são as mesmas de qualquer patógeno bacteriano. É importante dizer que a higiene é a melhor barreira de dispersão dos patógenos resistentes e patógenos em geral. As rotas de disseminação ambiental também são apontadas como importantes na transmissão da resistência a antibióticos. Então, esgotos, poeira, alimentos contaminados, viagens, entre outros facilitam a transmissão (BENGTSSON-PALME, KRISTIANSSON, LARSSON, 2017).

Os antimicrobianos são divididos em duas classes, os bactericidas, que matam e degradam o microrganismo atuando principalmente sobre a parede celular, como os β -lactâmicos sobre a membrana celular como a daptomicina ou DNA bacteriano como as fluoroquinolonas. A outra classe é conhecida como bacteriostática, que inibe a replicação microbiana. São bacteriostáticos as sulfonamidas, tetraciclina e macrolídeos e agem inibindo a síntese proteica. Alguns medicamentos são bactericidas para alguns microrganismos e bacteriostáticos para outro (NOGUEIRA, 2012).

No século passado, os antimicrobianos disponíveis eram considerados suficientes para tratar com efetividade as infecções causadas por várias

bactérias. Porém, o crescente surgimento de resistência microbiana aos antibióticos se tornou um grande problema para a saúde mundial e uma ameaça a humanidade.

Existem muitos fatores responsáveis pelo aumento da resistência microbiana e entre eles podemos considerar o mal uso dos antimicrobianos e conseqüentemente o uso em excesso, a prescrição inadequada destes medicamentos, onde em uma infecção viral os antibióticos são frequentemente prescritos acarretando em atraso no diagnóstico preciso e tudo isso influencia para um tratamento inadequado e contribui para o aumento da resistência (CERCEO, et al 2016; SEETHALER, et al 2019; MORRIS, CERCEO 2020).

Há também a hipótese que vem sendo muito bem reconhecida de que o meio ambiente é uma fonte importante e via de disseminação da resistência, porém a compreensão de sua contribuição nisto ainda é limitada. Muitos autores destacam a importância e a necessidade de adotar uma perspectiva mais abrangente sobre a resistência onde inclui seres humanos, animais e ambiente externo chamado de saúde única (ALLEN et al, 2010; PRUDEN et al, 2013; FINLEY et al, 2013; LEVIN, BAQUERO, JOHNSEN, 2014). Um maior conhecimento sobre como os fatores ambientais promovem a resistência a antibióticos pode nos ajudar na criação de modelos de como a resistência surge e é disseminada (BENGTSSON-PALME, KRISTIANSSON, LARSSON, 2017).

É de grande importância o conhecimento bioquímico e genético da resistência bacteriana para o melhor entendimento. Há diversos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias que fazem com que elas se tornem resistentes, como por exemplo a produção de β -lactamases e lactamases de espectro estendido, carbapenemases e aumento da atividade de efluxo e permeabilidade externa da membrana que causam a diminuição da concentração do antibiótico sem sua modificação química e transmissão do alvo. Além disso, as bactérias desenvolvem outros tipos de mecanismos de resistência, o que acaba disseminando genes de resistência via plasmídeos entre diferentes espécies (CERCEO, et al 2016; LERMINIAUX, CAMERON 2019). É proposto que os agentes antimicrobianos que afetam enzimas são os mais favoráveis a gerar resistência. Os que atingem de forma irreversível estruturas bacterianas induzem uma resistência mais lenta. Além dos mecanismos já citados, podemos incluir

também a modificação do sítio ativo alvo e modificação da permeabilidade da parede celular (NOGUEIRA, 2012).

Segundo Martinez, Coque e Baquero (2015), uma cepa é resistente a um antibiótico se sua concentração inibitória mínima for maior que para a cepa parental selvagem correspondente, então, um gene é definido como um gene de resistência quando sua presença permite que uma bactéria suporte uma concentração mais alta de antibióticos ou quando sua ausência aumenta a suscetibilidade ao antibiótico (MARTINEZ, COQUE, BAQUERO, 2015).

Novos fatores de resistência a antibiótico podem surgir em qualquer lugar e a qualquer momento. O número de células bacterianas na terra é estimado em cerca de 10³⁰, ou seja, oferece uma imensa variabilidade genética e com isso muitas oportunidades para mutações, rearranjos e transferência horizontal de genes. Então, novos fatores de resistência provavelmente aparecem regularmente, embora a grande maioria destes eventos não são detectados (KALLMEYER, et al 2012; MARTINEZ, COQUE, BAQUERO, 2015).

A transferência horizontal de genes é importante para a disseminação de genes de resistência, tanto novos como conhecidos, pois permite que a resistência se expanda além de clones específicos. Assim, essa transferência disponibiliza genes de resistência para uma parte muito maior da comunidade bacteriana em um ambiente específico, geralmente além dos limites das espécies. Em teoria, a transferência de genes pode ocorrer em qualquer lugar, porem para que sejam transferidos horizontalmente de bactérias ambientais para bactérias patogênicas, eles precisam por algum tempo, compartilhar o mesmo habitat e é muito mais provável de ocorrer entre bactérias filogeneticamente próximas. Por fim, a transferência de material genético entre células bacterianas é induzida por agentes estressantes como antibióticos e biocidas (MARTINEZ, 2011; SMILLIE, et al 2011; WIEDENBECK AND COHAN, 2011; JUTKINA, et al 2016; PORSE, et al 2017; ZHANG, et al 2017).

Um fator importante que determina o sucesso de um mutante resistente é o seu nível de resistência, que varia muito, dependendo do mecanismo de resistência, como já citado, e das condições sob as quais a resistência é medida. Geralmente são utilizadas as técnicas de difusão em disco, microdiluição em caldo ou testes E para determinação da concentração inibitória mínima (MIC).

Estes testes são baratos, rápidos e fáceis, não possuem muita sensibilidade. Alguns mecanismos de resistência resultam em um aumento muito pequeno que só podem ser detectados por outros testes como o *Time-Kill* (HUGHES, ANDERSSON 2017).

Outro problema que contribui para a atual crise dos antibióticos é o fato de que as empresas farmacêuticas anunciaram recentemente que não investiriam mais no desenvolvimento de novos antibióticos devido o resultado financeiro, pois segundo eles, os antibióticos devem ser baratos para uso em países em desenvolvimento (VENTOLA, 2015; MANTRAVADI et al, 2019; SEETHALER, et al 2019).

Mesmo dito isso, a ocorrência de resistência com certeza é algo preocupante devido as cepas resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos conhecidos, então há uma necessidade de produção de novas substancias que além do bom espectro de atividade, possua novos mecanismos de ação. Há várias abordagens para escapar dos mecanismos de resistência como por exemplo a coordenação de metais a antibióticos como uma tentativa de regresso da resistência. É demonstrado que complexos metálicos contendo antibióticos são, na maioria das vezes, mais ativos que a droga livre e possuem mais propriedades terapêuticas comparado ao antibiótico não coordenado (ROCHA, et al 2011).

2.3 Leishmaniose

As doenças tropicais relacionadas a parasitas são responsáveis por altas taxas de morbimortalidade e infectam milhões de pessoas em países em desenvolvimento (CHUA, et al 2017). A leishmaniose é uma doença infecciosa transmitida pela picada da mosca da areia do tipo *Lutzomyia* e diversas espécies de flebotomíneos causada pelo parasita intracelular do gênero *Leishmania*, endêmica em grandes áreas dos trópicos, subtropicos e bacia do mediterrâneo e acomete mais de 98 países. São 350 milhões de pessoas em risco e 12 milhões de casos (ALVAR et al, 2012; GRIENSVEN, DIRO 2012).

Os registros oficiais mostram que são diagnosticados por ano aproximadamente 58.000 casos de leishmaniose visceral através de contaminação por espécies de *L. donovani* e *L. infantum chagasi* e

aproximadamente 220.000 casos de leishmaniose cutânea causadas por espécies de *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* (FEIJÓ et al, 2016; MARAN et al, 2016).

É considerada um grande problema de saúde pública e dentre as infecções tropicais, é a segunda causa de morte para leishmaniose cutânea e quarta causa de morte para leishmaniose visceral (AKHOUNDI et al, 2017).

No século XIX, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Whright, Linderberg e Vianna a partir de pesquisas independentes, reconheceram este parasita como causador da leishmaniose (PIMENTA, FREITAS, SECUNDINO, 2012).

Este parasita possui duas formas diferentes (Figura 1). As que estão presentes nos vetores são alongadas, possuem flagelo e são móveis (promastigotas). As presentes no macrófago de hospedeiros vertebrados possuem forma arredondada e não possui flagelo aparente (amastigotas) (WHO,2016).

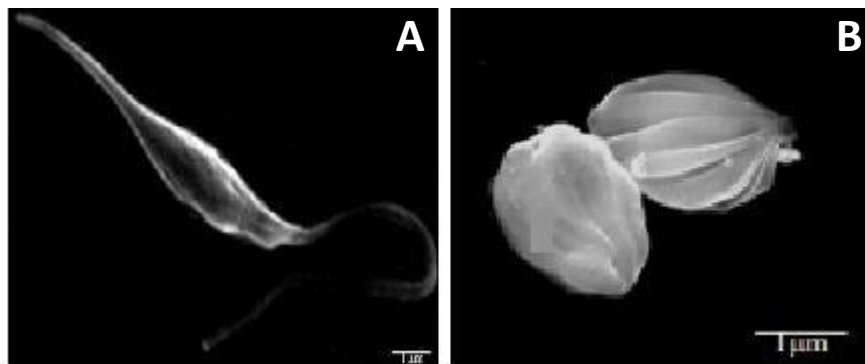


Figura 1: Fotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de *Leishmania infantum chagasi* nas formas promastigota (A) e amastigota (B) (fotos de Márcio Sobreira e Vanessa Freitas - Fiocruz - MG, CPqRR). Adaptado de: PIMENTA, FREITAS, SECUNDINO 2012.

No vetor, o ciclo de vida do parasita inicia-se quando a fêmea de flebotomíneo alimenta-se de sangue infectado com formas amastigotas. Elas passam por mudanças fisiológicas, morfológicas e ocorre a diferenciação para a forma promastigota que se inicia de 0 a 2 dias após a ingestão e em seguida ocorre uma forte multiplicação no intestino médio abdominal. Esta já é a forma

infectante para o hospedeiro vertebrado (LAWYER, et al 1987; MARQUES, et al 2016).

O padrão clínico varia de acordo com as características do parasita e dos aspectos genéticos do hospedeiro que determinam sua resposta imunológica e pode ser dividido em cutâneo (localizado e disseminado), muco cutâneo e visceral. (GUERRERO et al, 2017).

As formas promastigotas são de fácil cultivo e conseqüentemente, mais estudadas. É possível também cultivar as formas amastigotas através da infecção de macrófagos (PIMENTA, FREITAS, SECUNDINO, 2012). O presente trabalho estudou as formas promastigotas de *L. infantum chagasi* que desenvolve a leishmaniose visceral, devido à larga distribuição geográfica e a gravidade das manifestações clínicas (MARQUES, et al 2016).

2.3.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é endêmica em mais de 60 países em todo o mundo. Dentre os países com maior frequência desta doença estão Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em 2012 houveram entre 200.000 e 400.000 novos casos e em 2017 foram registrados entre 50.000 e 90.000 novos casos. Isto, aparentemente, demonstra um declínio da doença, porem a incidência varia, com picos a cada 8 e 15 anos (WILHELM, 2019). Sem o devido tratamento após os sintomas clínicos, ocorre o aumento da perda de peso e em dois anos o paciente vai a óbito por sepse devido a infecções bacterianas, anemia acentuada, insuficiência hepática ou sangramento (GRIENSVEN, DIRO 2012). Como complicação tardia, caso os patógenos permaneçam na pele, ocorrem erupções macropapulares que começam ao redor da boca e se espalham para o tronco, onde paciente imunossuprimidos são especialmente afetados (ZIJLSTRA, 2016).

Há uma relação entre imunossupressão e leishmaniose pois os pacientes podem permanecer assintomáticos por anos após a infecção até que, devido a imunossupressão a doença se manifeste. Portadores de HIV possuem risco aumentado em um fator de 100 a 2320 de desenvolver leishmaniose visceral. Apenas 30% desenvolvem sintomas típicos como febre, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (VANGRIENSVEN et al, 2014).

Em caso de suspeita de leishmaniose visceral, o diagnóstico de escolha é a detecção microscópica do patógeno através de punção da medula óssea. Outro método alternativo, porém, com sensibilidade parecida, é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que pode ser realizada a partir do sangue periférico (WILHELM, 2019).

O tratamento é realizado a partir de drogas sistêmicas. A anfotericina B é geralmente a droga de primeira escolha. O agente de segunda escolha é miltefosina, que pode ser administrada via oral. Os compostos de antimônio pentavalente, são utilizados como terapia há décadas, porém não são mais recomendados devido à resistência e significativos efeitos colaterais (BURZA, CROFT, BOELAERT 2018).

Após o início da terapia, a febre cessa em uma semana e os exames de sangue normalizam em duas semanas. Durante dois anos é necessário acompanhamento de três em três meses com PCR a partir do sangue periférico para detecção de uma possível recidiva (BURZA, CROFT, BOELAERT 2018; WILHELM, 2019).

É de grande importância o estudo e desenvolvimento farmacológico de moléculas e seus derivados com efeitos biológicos que podem ser relevantes como antiparasitários (DUARTE et al, 2016). Há estudos envolvendo a resposta imune do hospedeiro contra *L. infantum chagasi*, no desenvolvimento de novos fármacos através de novos compostos até a pesquisa de fármacos já existentes com efeitos além do seu alvo específico, mas também antiparasitário (UZCANGA et al, 2017).

2.4 Toxicidade Celular

A avaliação da toxicidade de substâncias químicas teve início nas primeiras décadas do século XX devido as inovações e expansões mercadológicas geradas pela revolução industrial e produções de guerra. Vários produtos foram liberados para o mercado sem os devidos testes que garantissem a segurança para população, o que gerou muitos acidentes toxicológicos com simples efeitos colaterais, má formação fetal e morte (VIEIRA, 2009).

Para avaliação biológica de produtos para saúde é necessário caracterizar a citotoxicidade *in vitro*, e isto, vem sendo aplicado como parte de uma série de testes relacionando o material testado e células de interesse para saúde humana. A partir disto é possível caracterizar reações adversas de citotoxicidade resultantes (MASSON, LOMBELLO 2016; LEMOS, 2018).

A utilização de culturas de células demonstra sucesso na avaliação da citotoxicidade de compostos ativos e biomateriais. Este modelo auxilia no estudo de funções e outros mecanismos pertinentes da linhagem determinada por um período de tempo estabelecido. Entretanto, proporciona uma visão limitada da complexa organização celular do corpo humano (RATNER, et al 2004).

Os fibroblastos são células de origem mesodermal com formato fusiforme e numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se estendem entre as fibras do tecido conjuntivo, possuem núcleo oval com cromatina fina e nucléolo evidente. Entre suas principais funções está a produção de fibras colágenas. Elas são amplamente distribuídas nos tecidos conjuntivos dos vertebrados fato que modula sua atividade metabólica e reflete em sua morfologia. (JACOB, 2011).

As linhagens utilizadas neste trabalho são HFF-1 que são fibroblastos originados do prepúcio humanos neonatais e são bastante utilizados para demonstrar o efeito de substâncias na indução da cicatrização de feridas cutâneas (AMIT, et al 2003; SOARES, 2017), além da linhagem HDFn que são fibroblastos dérmicos humanos neonatais e queratinócitos humanos imortalizados correspondente a linhagem HaCat.

Estes tipos celulares foram escolhidos baseado no uso dos mesmos como padrão ouro para testes de toxicidade celular dada a susceptibilidade que apresentam ao ser expostos a novas substâncias. Além disso a presença destas linhagens nas camadas epiderme e derme permitem ter uma ideia de como reagiria a pele ante a exposição das substâncias testadas. A escolha dos testes de viabilidade, atividade enzimática e em receptores específicos é de vital importância para avaliar parâmetros como a regeneração tecidual (LEMOS, 2018).

2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Como mencionado anteriormente no item 2.4 as técnicas de cultura celular permitem que os investigadores examinem *in vitro* os efeitos de diversos compostos sob condições controladas garantindo a reprodutibilidade e solidez dos resultados.

Entretanto, nestes tipos de ensaios não são considerados as interações entre as células e seu meio ambiente, de modo que no modelo *in vivo* as repostas podem ser totalmente diferentes.

Para minimizar estas diferenças entre os modelos *in vitro* e *in vivo* é necessária a realização de outros testes que permitam avaliar o estado metabólico das células, o mesmo pode ser avaliado através da produção de espécies endógenas reativas de oxigênio (EROs).

Espécies Reativas de oxigênio (EROs), são radicais livres, ou seja, moléculas altamente reativas devido a elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e possuem vida curta (GOUVEIA; LIMA 2017; BIRDEN, et al 2012; ARAÚJO; MELLO 2009).

A geração de EROs pode ser exógena, a partir de fontes como radiação UV, produtos químicos tóxicos, poluentes, envelhecimento, lesões e inflamação ou endógeno, de fontes intracelulares incluindo peroxissomos, mitocondriais mieloperoxidasas, que desempenham um papel fundamental na manutenção de um metabolismo celular equilibrado (VALLEJO; SALAZAR; GRIJALVA 2017; SIES, 2015).

Dentre as espécies reativas estão: superóxidos (O_2^-), radical hidroxila (OH^*), óxido nítrico (NO), radicais orgânicos (R^*), radicais peroxil (ROO^*), alcoxil (RO), radical tiol (RS), radical sulfonil (ROS^*), radical peróxido tiol (RSOO) e dissulfetos (RSSR), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (O_2), ozônio trioxigênio (O_3), hidróxidos orgânicos (ROOH), hipoclorito (HOCl), peroxinitrito (ONO^-), ânion carbonato peroxinitroso ($O=NOOCO_2^-$), ânion nitrocarbonato ($O_2NOCO_2^-$), dióxido de nitrogênio (NO_2) e a carbonila derivada de hidratos de carbono ou lipídeos altamente reativos (LIU; STORZ 2010; XU, et al 2013; YANG, CHEN, SHI 2019).

Estes, podem ser tóxicos e causar danos ao organismo quando agem sobre elementos vitais, como lipídeos, proteínas e DNA. Podem aumentar o risco

de doenças cardíacas e degenerativas, contribui com o envelhecimento (BECHER; NISSE; SKIBSTED; 2004; HALLWEL et al, 1995; TEMPLE, 2000), mutações e carcinogênese (HUANG et al, 2002).

Entretanto, em alguns processos celulares, a produção de EROs é necessária como por exemplo na defesa imunológica, na sinalização celular e na contração muscular (PÉREZ; SAURA, 2006; GIADA; MANCINI, 2009).

Neste estudo, avaliou-se a produção de EROs em cultura celular após a exposição aos compostos testados.

2.5 Bases de Schiff

As bases de Schiff são uma classe de iminas ou compostos orgânicos sinteticamente flexíveis que apresentam pelo menos um grupo $-R-C=N-$, e em uma extremidade possui um grupo aromático e na outra extremidade qualquer outro grupo. São tipicamente formadas pela condensação de uma amina primária e um aldeído ou cetona (BHAT et al, 1996).

A ligação $-C=N$ -imina nas bases de Schiff, desempenha um papel fundamental quanto as atividades biológicas de amplo espectro. O carbono eletrofílico e o nitrogênio nucleofílico nesta ligação, oferecem grandes probabilidades de ligação com diferentes nucleófilos e eletrófilos e com isso agindo e inibindo doenças específicas, enzimas ou replicação de DNA (HAMEED et al, 2016).

Descritas pela primeira vez por Hugo Schiff em 1864, foram estudadas como antifúngicos, antibacterianos, antimaláricos, antiinflamatórios, antivirais e agentes antitumorais. As bases de Schiff são quelantes seletivos de metais e as propriedades biológicas aprimoradas com a complexação de metais de transição (SCHIFF, 1864; ABU-DIEF, MOHAMED, 2015).

O grupo $C=N$ presente nas bases de Schiff possui uma forte propensão a formar complexos metálicos, entretanto a presença deste grupo sozinho não é suficiente para formar complexos estáveis com um íon metálico através do par de elétrons livres. Para que estas bases formem complexos estáveis, é necessário que haja um outro grupo em sua estrutura, preferivelmente um grupo hidroxila (OH) (MATSUMOTO, 2013).

Estes complexos de metais são conhecidos desde meados do século XIX. É muito citado na literatura e geralmente são monodentados, bidentados, tridentados, tetradentados. Oferecem uma variedade de geometrias e estados de oxidação, o que torna estes complexos uma excelente plataforma para novas terapias inovadoras (BAJEMA, ROBERTS, MEADE 2019; MORE et al, 2019).

Desde a descoberta da cisplatina como uma droga anticâncer muito eficaz, porém tóxica, os estudos têm se concentrado no desenvolvimento de terapias menos complexas e cada vez mais eficazes para complexos de metais de transição. Uma opção para atenuar a toxicidade de complexos de metais é escolher vestígios de metais essenciais que os humanos toleram bem como por exemplo o cobalto, que mesmo com um potencial farmacêutico, ainda é relativamente ignorado pela química farmacêutica. Existem boas análises de pesquisas terapêuticas baseadas em cobalto (CHANG, SIMMERS, KNIGHT 2010; MUNTEANU, SUNTHARALINGAM 2015).

Entre os oligoelementos essenciais se encontram o cobre e o cobalto e o potencial benéfico ou tóxico depende exclusivamente da quantidade administrada, assim em média um adulto de 70 kg tem 100 mg de Cobre e 2 mg de Cobalto. (ZORODDU et al, 2019).

O cobre está presente em vários alimentos em forma de proteína como rim e fígado, ostra, lagosta, cogumelos, nozes, amêndoas e, portanto, a ingestão de cobre excede a demanda dos tecidos e os mecanismos homeostáticos são capazes de regular a absorção e a exportação para manter um suprimento suficiente e ao mesmo tempo minimizar as propriedades tóxicas. É importante para várias reações enzimáticas como doador de elétrons. Na cadeia respiratória das mitocôndrias, a enzima de cobre citocromo c. oxidase atua como transportador de elétrons (SOLOMON, 2006; PUCHKOVA et al, 2018).

A absorção do cobre ocorre na maioria das vezes no intestino delgado e passa pela membrana da mucosa por difusão passiva. Quando chega ao líquido intersticial e ao plasma, liga-se a albumina e a transcuperina e é transportado para o fígado onde é armazenado (MONTEIRO, 2017).

O cobalto desempenha um papel importante em vários processos biológicos e é predominantemente encontrado na forma de vitamina B12 (cobalamina). As diferentes formas de cobalaminas são necessárias para

formação de glóbulos vermelhos, síntese e regulação de DNA e manutenção da função normal do cérebro e dos nervos. Devido o papel do cobalto nos processos biológicos os seres humanos desenvolveram mecanismos para superar a sobrecarga de cobalto, portanto ele é menos tóxico para os seres humanos do que os metais não essenciais, como por exemplo a platina (MUNTEANU, SUNTHARALINGAM 2015).

Este elemento é absorvido em sua maioria pelo intestino e é favorecida pela lactose e pela albumina. A excreção é via urinária (MONTEIRO, 2017).

As bases de Schiff complexadas com metais possuem um potencial antimicrobiano. No ano de 1952, ocorreu a primeira investigação da atividade biológica de complexos de cobalto determinando-se que eram bactericidas e bacteriostáticos em concentrações muito baixas (μg), além de baixa toxicidade em camundongos (DWYER, et al 1952; BAJEMA, ROBERTS, MEADE 2019).

O avanço médico mais significativo em termos de composto de cobalto é o desenvolvimento clínico do Doxovir (CTC-96) para o Herpes labial. É um composto cobalto (III) bis(acetylaceton)ethylenediimine com dois ligantes de 2-methylimidazole. Este medicamento exibe efeitos potentes em cepas resistentes e concluiu os ensaios clínicos na fase II. O mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas há a hipótese de que ele induza seu efeito terapêutico pela ligação covalente a resíduos de histidina no local ativo de uma enzima viral que é de extrema importância para a replicação do Herpes (MUNTEANU, SUNTHARALINGAM 2015).

Complexos de Cu (II), Co (II), e Ni (II) foram descritos usando o ligante derivado da base de Schiff 2-amino-3-hidroxipiridina e 3-metoxisalicilaldeído e estudadas as atividades antimicrobianas e citotoxicidade em células de carcinoma in vitro onde se obtiveram resultados promissores para estes testes (ABDEL-RAHMAN et al, 2016). Bases de Schiff derivadas de salicialdeído e diamina e seus complexos de cobalto, demonstraram resistência a luz e possuem capacidade de armazenamento e não se degradam mesmo em gases ácidos (MORE et al, 2019).

O mecanismo de ação das bases de Schiff ainda não é totalmente conhecido. Foram observados interrupção em três processos celulares normais que são atividade enzimática do local de ligação do metal, respiração celular e

produção de proteínas. Bases de Schiff não complexadas podem afetar estes processos e a complexação geralmente aumenta seu efeito citotóxico. Isto é atribuído a teoria de quelação de Tweedy que diz que a quelação permite a deslocalização de elétrons e o compartilhamento de carga entre o centro do metal e seus ligantes doadores (BAJEMA, ROBERTS, MEADE 2019).

2.5.1 Espectroscopia Ramam

Uma técnica que vem ganhando destaque em diversas áreas científicas é a espectroscopia Ramam (DAS; AGRAWAL, 2011) e tem grande importância na análise de materiais (TOLEDO, 2015). A interação da radiação eletromagnética com a matéria, pode originar o espalhamento, que nada mais é que a mudança na propagação dessa radiação. Pode-se ocorrer dois tipos de espalhamentos, o elástico, onde a radiação é espalhada na mesma frequência da radiação inicial e a inelástica, onde a radiação é espalhada em frequência diferente da radiação inicial (SMITH; DENT, 2013; OLIVEIRA, 2018). Este, nos possibilita obter informações sobre a composição química do material, ou seja, é obtido a "impressão digital" do objeto testado (URABE; TOMINAGA; KUBOTA 1983).

Um típico espectro Ramam apresenta picos indicativos de ligações químicas e suas vibrações. As linhas espectrais são fornecidas em função de frequências denominadas deslocamentos Ramam e são expressas em cm^{-1} (FARIA; SANTOS; GONÇALVES, 1997).

Esta técnica, possui vantagens como rapidez, não-destrutiva, utilização de pequena quantidade de amostra, custo reduzido pois não necessita de reagentes para processamento da amostra (CHOO-SMITH, et al 2001; JARVIS; GROOMACRE 2004; HUANG, et al 2007). Então a partir destas justificativas, foram coletados os espectros Ramam dos materiais utilizados neste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físicas e biológicas do ligante livre dos derivados orgânicos da base de Schiff N,N'-bis(Salicilideno)-1,2-fenilenodiamina e os complexos com cobre (II) e cobalto (II) para aplicação na inibição/morte microbiana e leishmanicida.

3.2 Objetivos específicos

Determinar as diferenças na estrutura física do ligante livre da base de Schiff (salofen) e seus complexos com Cu (II) e Co (II) através da técnica de difração de raios X.

Avaliar o espectro Ramam do ligante livre salofen e dos complexos com cobre (II) e cobalto (II).

Avaliar os picos do espectro Ramam do complexo de cobalto após esterilização dos materiais por autoclavagem.

Avaliar a atividade antimicrobiana dos complexos de Cu (II) e Co (II) in vitro utilizando os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) em espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas geralmente envolvidas em infecções nosocomiais.

Determinar o tempo de morte para algumas bactérias após exposição ao ligante livre salofen e o complexo de cobalto.

Determinar o efeito da associação do ligante livre a antibióticos comerciais amicacina e gentamicina através da técnica de modulação de antibióticos.

Avaliar a atividade citotóxica in vitro dos complexos sobre o parasita *L. infantum chagasi* utilizando o método colorimétrico do Alamar Blue em 24 e 48 horas.

Determinar a toxicidade in vitro do ligante livre salofen e os complexos Cu (II) e Co (II) em fibroblasto de pele humana HFF-1 em 24, 48 e 72 horas.

Determinar a toxicidade in vitro do ligante livre salofen em fibroblastos HDFn em 24, 48 e 72h.

Determinar a toxicidade in vitro do ligante livre salofen em queratinócitos HaCat em 24, 48 e 72h.

Avaliar a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em queratinócitos HaCaT após exposição de 72 horas ao ligante livre salofen e o complexo de cobalto.

Avaliar a migração celular de fibroblastos (HDFn) e queratinócitos (HaCaT) após exposição aos compostos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização das moléculas

A base de Schiff salofen, foi sintetizada pelo Prof. Dr. Thiago Andrade de Toledo no Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT. O material foi preparado através da condensação de 1,2-fenilenodiamina (20 mmol) e salicialdeído (10 mmol) em solução etanólica (40 mL) sob aquecimento constante a 60°C e agitação magnética por duas horas (Figura 2).

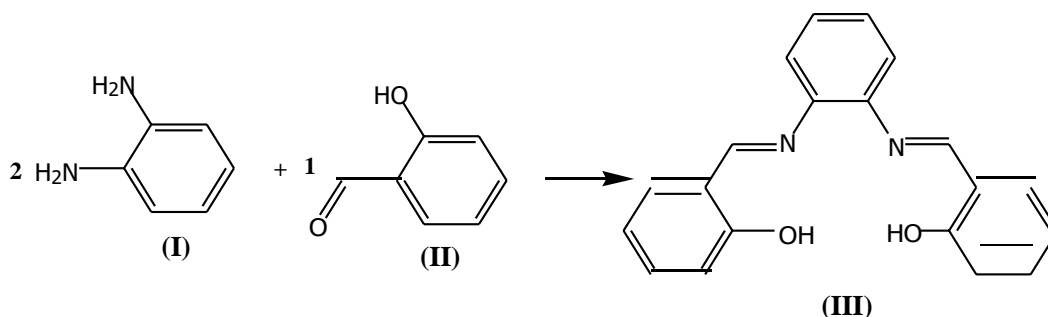


Figura 2 Síntese da salofen (III), $C_{20}H_{16}N_2O_2$, a partir da reação com 1,2-fenilenodiamina (I) e salicialdeído (II).

Após a fabricação da salofen pura foram preparados os complexos com os metais escolhidos Cobre (II) e Cobalto (II). A salofen e o íon metálico foram solubilizados separadamente em balão volumétrico contendo 100 mL de etanol aquecido a temperatura de 60 °C sob agitação. O íon metálico, tanto o cobre (II) quanto o cobalto (II), foram adicionados por gotejamento na solução contendo Salofen. Esta, ficou sob agitação magnética com aquecimento a 60 °C durante três horas e sua fórmula geral está representada na figura 3.

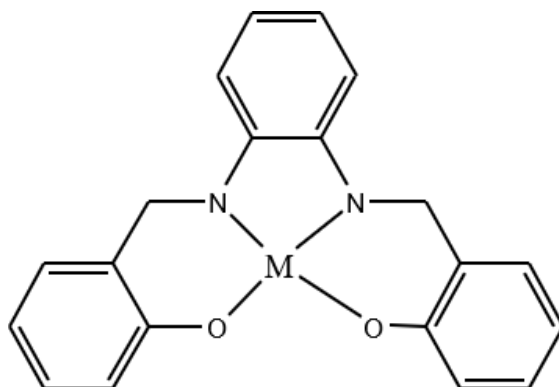


Figura 3 Fórmula geral da base de Schiff Salofen complexada com cobre (II) e cobalto (II), onde M representa Cu e Co.

Após esta etapa, foi observado a formação de precipitado, sendo filtrado e coletado. O resultado pode ser observado na figura 4.

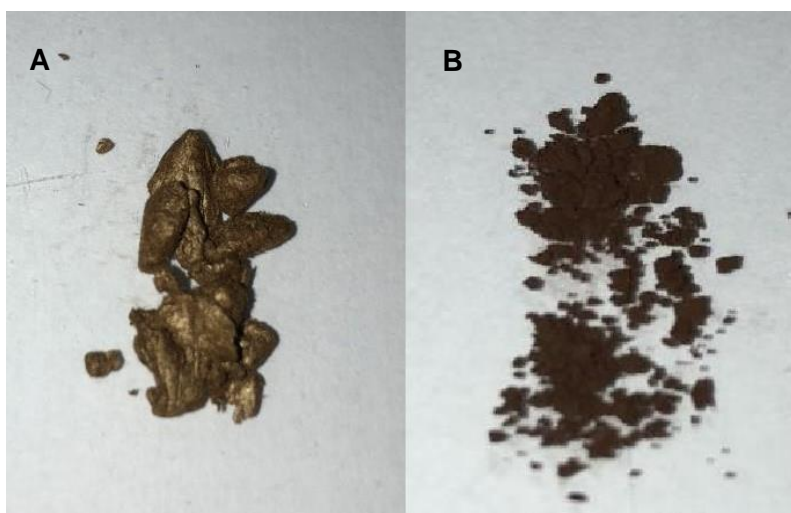


Figura 4. Aspecto da salofen complexada com A) cobre (II) e B) cobalto (II). Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 Difração de raios X

As medidas de difração de raios X nas amostras foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar,

usando o difratômetro XDR 6000 Shimadzu. Os espectros foram coletados com radiação K_{α} de um alvo de cobre com 2θ entre 5° e 90° para as amostras em pó, sendo o passo de medida de $1^{\circ}/\text{min}$.

Para o estudo das características estruturais, fases presentes e, cálculo das densidades teóricas nas amostras, foram usados o banco de dados da Inorganic Structure Database (ICSD) (GAVELÁN, 2017; TOLEDO et al, 2016).

4.3 Espectro Ramam

Os espectros Raman foram coletados com espectrofotômetro LabRam HR Evolution Horiba Jobin Yvon, com resolução nominal de 2 cm^{-1} , usando o laser de He-Ne emitindo em 633 nm. Estas medidas foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar em parceria com o Prof. Dr. Ariano de Giovanni Rodrigues

Foram coletados espectros do ligante livre salofen, do complexo de cobre e do complexo de cobalto sem esterilização e em seguida foram coletados espectros Ramam do complexo de cobalto após esterilização dos materiais por autoclave.

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana

4.4.1 Microrganismos

Os ensaios foram realizados em duas etapas desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da UFSCar, e no Laboratório de Biotecnologia Microbiana na Universidade de São Paulo (USP) da Profa. Dra. Márcia Nitschke, com a finalidade de abranger um maior número de cepas bacterianas testadas. As bactérias utilizadas como modelo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Citrobacter freundii* (ATCC10231), *Salmonella setubal* (ATCC 19196) e

Pseudomonas aeruginosa. (ATCC 14502). As cepas estão acondicionadas em freezer a -80 °C. Para os testes realizados em colaboração foram utilizadas as cepas *B. subtilis* (ATCC 21332), *E. coli* (ATCC 25922), *M. luteus* (ATCC 4698), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417), *Salmonella setubal* (ATCC 13076), *S. aureus* (ATCC 8095) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557).

4.4.2 Padronização do inoculo bacteriano

4.4.2.1 Testes de Microdiluição Fase 1 (LaMiB)

Para a padronização do inoculo bacteriano, foram transferidas colônias da bactéria desejada para salina 0,9% até atingir 0,5 na escala de Mc Farland. A densidade ótica (DO) foi obtida em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-22) no comprimento de onda de 620 nanômetros (nm), o que representa aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A partir desta solução foi realizada uma diluição 1:10 em salina 0,9% para que o inoculo inicial do teste seja $1,0 \times 10^7$ UFC/mL.

4.4.2.2 Testes de Microdiluição Fase 2 (Laboratório de Biotecnologia Microbiana/USP)

Células das linhagens selecionadas estocadas em freezer a -20 °C foram transferidas para meio sólido e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período de incubação um novo repique foi realizado e as células foram novamente incubadas a 37 °C por 24 h. Na sequência, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma alíquota de células foi transferido para uma solução salina (NaCl 0,86%) até obtenção de uma suspensão de densidade ótica de 0,1. Esse padrão corresponde a cerca de 10^8 UFC.mL⁻¹. Essa suspensão foi então diluída 10 vezes em solução salina para obtenção de 10^7 UFC.mL⁻¹ (CLSI M7-A9, 2012).

4.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima

4.4.3.1 Fase 1 - LaMiB

Para essa fase do experimento foi utilizada a metodologia estabelecida pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Foi realizado em placa de 96 poços, onde foi adicionado 100 μL de caldo Mueller Hinton (CMH) (KASVI, BR) em todos os poços. Após este processo, foi adicionado na coluna 1, 100 μL da primeira concentração do complexo de cobre que foi homogeneizado e transferido 100 μL para o seguinte poço e assim sucessivamente até a coluna 5 e nesta última os 100 μL foram desprezados para obtenção do mesmo volume final do poço. Em seguida este mesmo processo foi realizado para o complexo de cobalto nas colunas 7 a 11. Os compostos foram diluídos com dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e CMH e as concentrações testadas foram de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Feita a diluição seriada dos dois complexos, foi acrescentado 20 μL da suspensão bacteriana nos poços de teste (linhas A, B, C e D). As linhas E, F, G e H foram utilizadas para os brancos que contém os mesmos componentes dos poços teste exceto a bactéria. A coluna 12 foi utilizada para o controle positivo de crescimento contendo apenas CMH e o inóculo bacteriano e os brancos dos controles contém apenas CMH e 20 μL de salina estéril. Os brancos podem ser considerados também como controle negativo para comprovação da esterilidade. O mapa da placa está demonstrado na figura 5. Ao final do preparo, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após este período foi realizado o teste CBM descrito no próximo item e o corante revelador utilizado foi a resazurina 0,04% (Alamar Blue®) (SIGMA-ALDRICH, EUA) diluída em tampão fosfato salino (PBS) e filtrada para esterilização. Foi adicionado 20 μL do revelador em todos os poços.

O tempo de espera para a mudança de cor nos poços em que houve crescimento bacteriano foi de 40 minutos +/- 20 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 630 nm em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®).

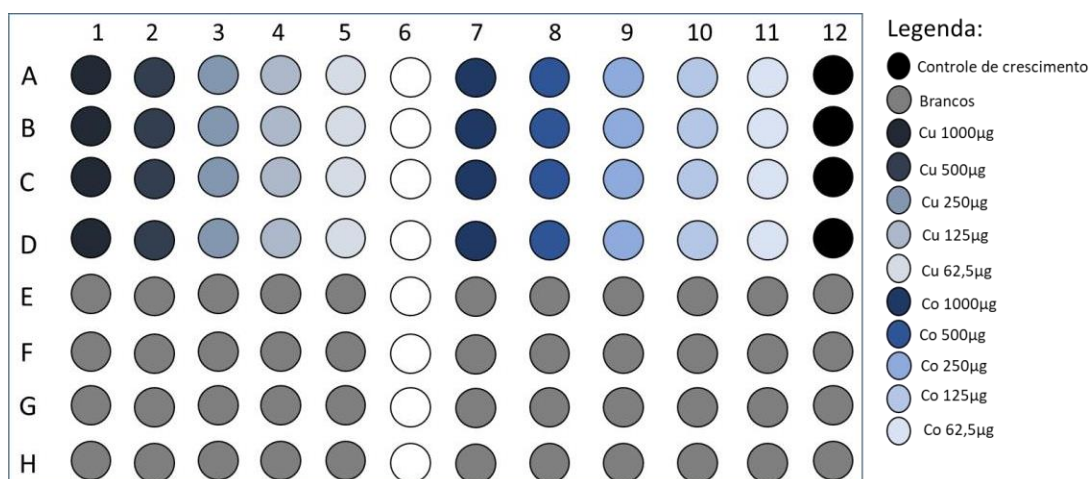


Figura 5 Mapa da placa de 96 poços utilizado para todas as cepas bacterianas nos testes de microdiluição realizados no Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas. Coluna 6: poços vazios

Fonte: Acervo pessoal.

4.4.3.2 Fase 2 - Laboratório de Biotecnologia Microbiana

Foram preparadas as soluções do ligante livre salofen e os complexos de cobre e cobalto estéreis dissolvidos em meio de cultura na concentração de 2000 µg.mL⁻¹. Para montagem da placa, foram adicionados 100 µL do meio de cultura Mueller Hinton diluído em água em cada um dos 96 poços da placa. Foram adicionados 100 µL dos complexos na primeira coluna e realizada uma diluição seriada passando 100 µL para a coluna seguinte até a coluna de número 10. Por fim, 20 µL de inóculo padronizado foram adicionados nas colunas de 1 a 11. A coluna 11, contendo somente meio e células, foi o controle positivo, enquanto a coluna 12 foi o controle negativo contendo somente meio ou meio e salofen (CLSI, 2012).

Depois de montada, a placa foi incubada por 24 h a 37 °C sem agitação. Após este período, foram retiradas amostras para determinar a CBM. Em seguida foram adicionados 20 µL de solução de MTT (1 mg.mL⁻¹ dissolvido em água destilada) na placa de 96 poços e a mesma foi incubada por 1 h a 37 °C sem agitação para determinar o CIM (CLSI, 2012).

4.4.4 Determinação da concentração bactericida mínima

Os testes da CIM foram realizados em quadruplicata na placa e para a realização da CBM foi escolhida a linha A para o plaqueamento. Foi retirada uma alíquota de 10µL de cada poço e plaqueado em ágar Mueller Hinton (MHA). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. É considerado a CBM a menor concentração que não houve crescimento bacteriano.

4.4.5 Curva de sobrevivência (*Time Kill*)

Este ensaio também foi realizado em duas partes. Uma em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Microbiana e foram escolhidos os melhores resultados obtidos a partir dos testes de CIM e CBM, que foi o ligante livre Salofen e o complexo de cobalto (II) sobre *S. aureus* (ATCC 8095). A outra parte foi realizada no LaMiB, onde o complexo de cobalto (II) foi utilizado sobre as bactérias escolhidas *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *E. faecalis* (ATCC 29212).

Após padronização do inóculo conforme descrito no item 4.3.2.2, uma alíquota de 0,5 mL foi adicionada em 2,5 mL de meio de cultura MH contendo diferentes concentrações do complexo, a saber, 0, 250 (CIM) e 2000 (CBM) µg.mL⁻¹. Os tratamentos foram então incubados a 37 °C sem agitação. Nos intervalos de tempo selecionados (0, 2, 4, 6, 8, 10, 16 e 24 horas) uma alíquota de 0,1 mL de cada tratamento foi retirada e adicionada a 0,9 mL de solução salina (NaCl 0,86%) e realizada uma diluição seriada (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) (CLSI, 2012). Com o objetivo de contar as células viáveis presentes nos tratamentos em determinado tempo, gotas de 15 µL de cada diluição foram semeadas em meio sólido (Ágar Nutriente) e incubadas a 37 °C por 24 h seguida da contagem de colônias (MILES e MISRA, 1938).

Para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{UFC.mL}^{-1} = \frac{(\text{Média de colônias contadas} \times \text{Diluição} \times 1000)}{\text{Volume da gota em } \mu\text{L}}$$

4.5 Modulação da atividade de antibióticos

O teste foi realizado com a base de Schiff (Salofen) livre para posterior teste com os complexos e o microrganismo utilizado foi *S. aureus* (ATCC 6538). Os antibióticos testados foram amicacina (SIGMA-ALDRICH) e gentamicina (SIGMA-ALDRICH). Para avaliação da atividade moduladora a CIM dos antibióticos foi avaliada na presença do salofen em uma concentração subinibitória de 156 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Primeiramente foi detectado a CIM dos antibióticos puros sobre a cepa. Para isto iniciou-se as diluições seriadas na placa de 96 poços na concentração de 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em paralelo, foi realizada a CIM dos antibióticos associados ao salofen. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h. Após este período foi utilizado o revelador resazurina para obtenção dos resultados. A CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de cor da resazurina.

A CIM obtida da combinação dos antibióticos e salofen foi comparada a CIM obtida dos antibióticos puros e a partir daí observa-se o aumento ou diminuição da CIM original. O cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi realizado para obter um coeficiente que mostrasse se a associação do salofen com os antibióticos produziu efeito sinérgico ($\text{CIF} \leq 0,5$), indiferente ($4,0 > \text{CIF} > 0,5$) ou antagonista ($\text{CIF} > 4,0$) determinado através da seguinte fórmula (MACKAY, MILNE, GOULD 2000):

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM do antibiótico combinado com salofen}}{\text{CIM do antibiótico isolado}}$$

4.6 Determinação da atividade leishmanicida

As cepas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* sensíveis a óxido nítrico (NO), foram cedidas pelo Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Utilizou-se o meio de cultura 199 (SIGMA-ALDRICH, EUA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (LGC, BR), 5% de antibiótico penicilina e estreptomicina (GIBCO, EUA), 3,042 mL de L-glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA) para cada 1000 mL. As células foram cultivadas em frascos T para cultura celular (KASVI, BR) de 75 cm², onde foi adicionado 5 mL de meio suplementado e as cepas de *L. infantum chagasi*. O frasco T foi acondicionado em local escuro à 23 °C e o crescimento celular e viabilidade foram avaliados pela contagem com o corante vital Tripán Blue (SIGMA ALDRICH, EUA) e pela observação no microscópio durante o tempo necessário para a troca do meio e passagens até atingir a quantidade celular desejada. As concentrações utilizadas foram 2000 µg.mL⁻¹, 1000 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹ e 125 µg.mL⁻¹. O composto foi diluído em meio 199 e Tween 80 a 1%. A concentração celular utilizada foi de 1x10⁵ cels.mL⁻¹. Pipetou-se 100 µL de meio em toda microplaca e 100 µL da diluição do composto nos poços da primeira fileira e a partir daí foi realizada a diluição seriada. Nos poços do controle positivo, pipetou-se apenas meio 199 e *Leishmania* e como controle negativo utilizou-se hipoclorito de sódio a 3%. As placas foram incubadas a 23°C (SIFAQUI et al, 2014), por 24 e 48 horas. Após o primeiro período de 24 horas, utilizou-se a resazurina para o teste colorimétrico, onde pipetou-se nos poços 20 µL do corante diluído em PBS na concentração de 1,5 mM e o mesmo ocorreu com a segunda placa após 48 horas. As placas foram mantidas em recipiente de alumínio protegido da luz com a concentração de CO₂ mantida entre 5 e 10% com o auxílio de uma vela. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific®) no comprimento de onda de 650 nm.

4.7 Determinação da citotoxicidade

4.7.1 Linhagem

A linhagem de célula testada neste estudo foi o fibroblasto de pele humana HFF-1, cedido pela Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal do Laboratório de Investigação Endócrino Metabólica (LIEM) da UFSCar onde os testes foram realizados. Os fibroblastos (HDFn) e queratinócitos (HaCat), são

pertencentes ao Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP).

4.7.2 Meio de cultivo

O meio utilizado para os fibroblastos foi o α -MEM (Minimum Essential Medium) (SIGMA-ALDRICH, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), (HyClone, THERMO SCIENTIFIC, EUA), HEPES (SIGMA-ALDRICH, EUA), bicarbonato de sódio (SIGMA-ALDRICH, EUA), L-glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA), L-arginina (SIGMA-ALDRICH, EUA), e penicilina/estreptomicina 1% (GIBCO, EUA). Para HaCaT foi utilizado o Gibco Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) suplementado com HEPES (SIGMA-ALDRICH, EUA), bicarbonato de sódio (SIGMA-ALDRICH, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB), (HyClone, THERMO SCIENTIFIC, EUA).

4.7.3 Cultura celular

As linhagens são mantidas em criotubos em nitrogênio a -196°C . Para o descongelamento e ativação destas células, a suspensão do criotubo foi transferida para um tubo de 15 mL (BD, EUA) com 9 mL de meio de cultura e foi centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O pellet foi ressuspenso em meio de cultura e transferido para o frasco T (GREINER, EUA) de 75 cm². Elas foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ até atingir a confluência (preencher os espaços vazios da garrafa) de 80%. A partir daí, iniciou-se a expansão das células.

Para esta expansão foram necessárias cinco passagens, que consistem em retirar o meio de cultura da garrafa, lavar com uma solução de PBS estéril e adicionado 4 mL de enzima *Tryple* (GIBCO, EUA) e mantidos por 7 minutos em incubadora para que as células possam desaderir do frasco. Após esta etapa, foi adicionado 12 mL de meio de cultura para que a ação da enzima pare. O conteúdo do frasco T foi centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células resuspendidas em meio de cultura que foram transferidas para outros frascos T até atingir a quantidade necessária de células.

4.7.4 Teste de proliferação celular

Para o ensaio de citotoxicidade foram testados tanto os complexos quanto a salofen livre sobre fibroblastos (HFF-1 e HDFn). Para os queratinócitos (HaCat) foi testado somente o ligante livre salofen. As concentrações testadas foram $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foram diluídos em meio de cultura e *Tween* 80 a 1%.

Foram inoculados 2×10^4 células.mL⁻¹ em placas de 96 poços (KASVI, BRA), mantidas em meio de cultivo e incubadas por 24 horas para aderência celular. Após este período, foram adicionados 100 μL das diluições dos compostos aos poços. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, por 24, 48 e 72 horas e após cada período, foi utilizado o método colorimétrico pelo 3- (4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) (SIGMA-ALDRICH, EUA). Nas células metabolicamente ativas, a enzima mitocondrial desidrogenase reduz o reagente MTT (amarelo) ao formazan (roxo). Após a adição do MTT nas placas de cada horário, aguardou-se 4 horas e após o período de incubação foi adicionada a solução de solubilização e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 570 nm.

4.7.5 Avaliação intracelular da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

Para detecção das EROs, foi utilizada a sonda fluorescente DCFH-DA (2',7'-Diclorodihidrofluoresceína Diacetato) (Sigma-Aldrich) (WAN et al, 1993). A célula testada para produção de EROs foi a HaCaT frente à exposição ao ligante livre Salofen e o complexo com cobalto nas concentrações de 1000, 250 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As células foram cultivadas e plaqueadas como citado anteriormente nos itens 4.6.3 e 4.6.4 e a produção de EROs foi avaliada em 72 horas. Após este período e a exposição aos compostos, foi retirado o meio de cultura e adicionado peróxido aos poços de controle positivo e após trinta minutos, foi adicionada a sonda em todos os poços da reação que ocorreu durante 30 minutos. Após esta etapa, os poços foram lavados com PBS 1x. A leitura da

emissão de fluorescência foi medida entre 485-330 nm em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®).

4.7.6 Migração celular

O protocolo para este ensaio foi adaptado de Liang e colaboradores (2007). Para este teste foram utilizadas placas de cultura de 48 poços (KASVI, BR). As células testadas foram fibroblastos HDFn e queratinócitos HaCat e foram inoculadas 2×10^5 cels/poço. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas. Após este período e consequente aderência das células ao fundo do poço, foi feito um risco vertical com o auxílio de uma ponteira de 200 µL e em seguida os poços foram lavados com PBS e adicionado aos poços 500 µL de meio de cultura e 500 µL das concentrações dos compostos que foram de 1000 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹, 125 µg.mL⁻¹ e 62,5 µg.mL⁻¹. Após este processo de preparação da placa e adicionados os compostos, os poços foram fotografados em microscópio invertido para registro fotográfico com uma câmera acoplada. Para a linhagem de fibroblasto foi fotografado o tempo 0 e após este, foram feitos registros de 6 em 6 horas durante as primeiras 24 horas e um registro em 48. Para a linhagem de queratinócitos o processo foi o mesmo, porém nas primeiras 24 horas os registros foram feitos de 8 em 8 horas, um registro em 48 horas e um em 72 horas.

4.8 Análise estatística

Os resultados das análises dos dados, foram tratados estatisticamente utilizando o programa Prism versão 5.01, utilizando testes de homogeneidade, *Kolmogorov* para teste de normalidade e para verificar se existem diferenças significativas entre as amostras, foram utilizados os métodos de *Tukey's* e *Kruskal-Wallis*. Para construção dos gráficos de difração de raios-x, foi utilizado o *software* Origin Pro versão 9.

5. RESULTADOS

5.1 Difração de raios x

O ligante livre e os complexos foram submetidos ao teste de difração de raios X e estes resultados estão expressos na figura 6.

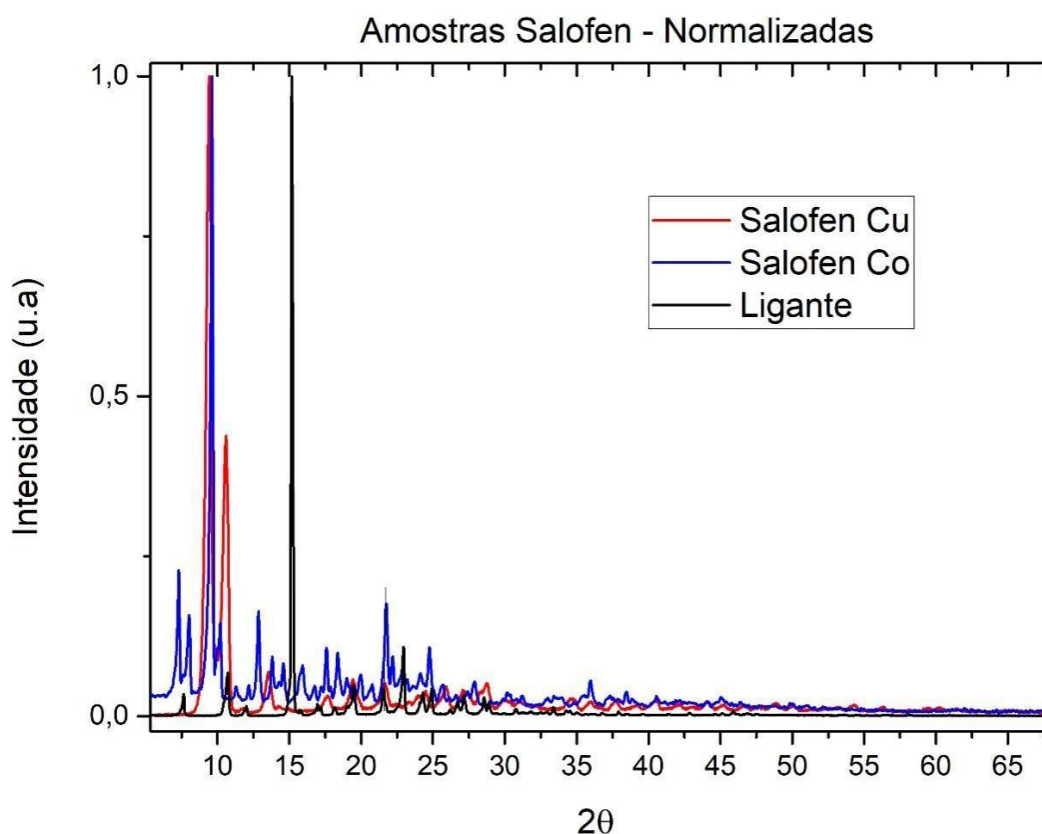


Figura 6. Difração de raios x do ligante livre da base de Schiff salofen e seus complexos metálicos Co (II) e Cu (II)

Podemos observar que o complexo de cobalto demonstrou uma maior quantidade de picos. Ele se assemelha mais ao ligante livre e o complexo de cobre apresenta maiores diferenças. Os picos do complexo de cobre são mais espaçados e possuem uma abertura maior quando comparado ao ligante livre e o complexo de cobalto, onde os picos são mais estreitos. Porém a tendência dos três materiais testados é ter em média picos de intensidade na região de 10/15 (2θ).

5.2 Espectro Raman

A formação dos complexos de salofen com os íons metálicos foram evidenciadas pela modificação nas bandas Raman (figura 7) como, por exemplo, deslocamento de bandas para maiores e/ou menores números de onda, além das mudanças nas intensidades e/ou aparecimento/desaparecimento de modos vibracionais, em especial, na região espectral entre 1300 e 1650 cm^{-1} , com destaque aos modos vibracionais associados ao estiramento de C=C e de C=N em 1609 cm^{-1} e ao dobramento de COH e CCH em 1586 e 1561 cm^{-1} .

Por exemplo, no espectro Raman do complexo de Co, verifica-se que a banda atribuída ao estiramento de C=C e C=N sofre um ligeiro deslocamento para 1614 cm^{-1} em relação ao mesmo modo na Salofen pura, enquanto que a banda descrita como dobramento de CCH aparece em 1580 (exibe ganho de intensidade relativa) e 1539 cm^{-1} . O deslocamento para menores números de onda, em torno de 22 cm^{-1} , da última banda evidencia a complexação do salofen com os íons de Co, conforme proposto. Ademais, a banda atribuída ao dobramento de COH em 1453 cm^{-1} no espectro Raman da Salofen pura para 1440 cm^{-1} no espectro Raman do complexo de Salofen-Co corroboram com a análise.

No caso do espectro Raman da Salofen-Cu, evidencia-se a formação do complexo metálico pela redução da intensidade Raman da atribuída ao estiramento de C=C e C=N em 1611 cm^{-1} acompanhado pelo ganho de intensidade relativa da banda em 1596 cm^{-1} , quando comparado ao espectro da Salofen pura. Nota-se também o deslocamento da banda atribuída ao dobramento de C-O em 7 cm^{-1} , bem como ganho de intensidade relativa em decorrência da complexação com o íon metálico.

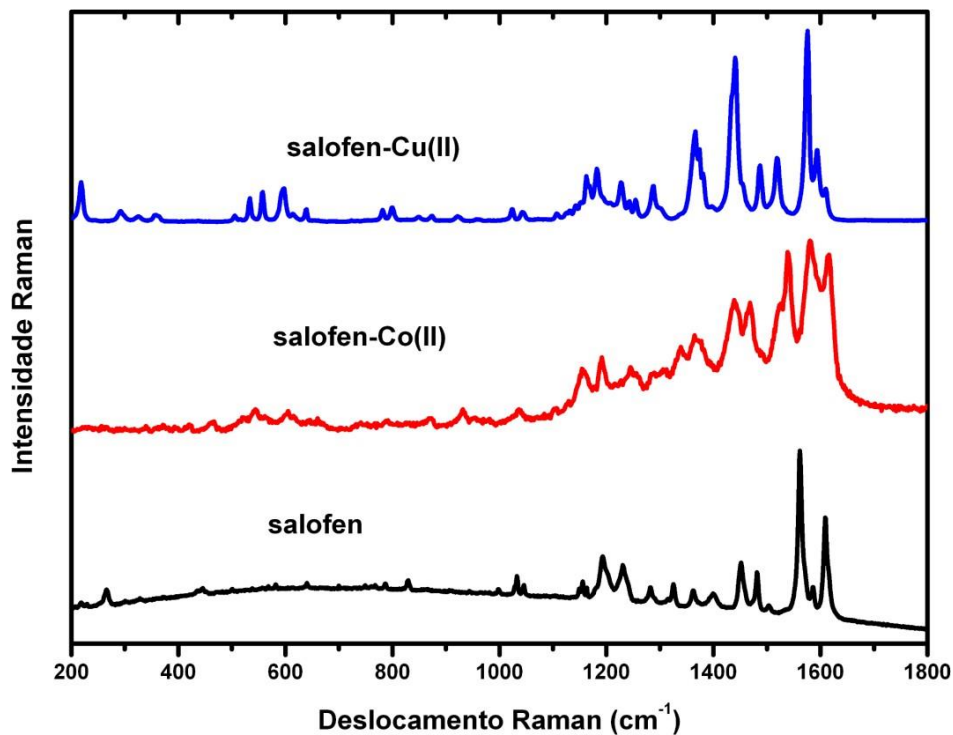


Figura 7 Espectro Raman do ligante livre Salofen e seus complexos com Co(II) e Cu(II).

Na figura 8, podemos observar o espectro Raman do complexo de Co após passar por esterilização por processo de autoclavagem. O gráfico mostra que não houve diferenças entre os picos obtidos do material antes e após autoclavagem, ou seja, podemos concluir que este processo, que utiliza pressão e calor não altera as características físico-químicas deste composto.

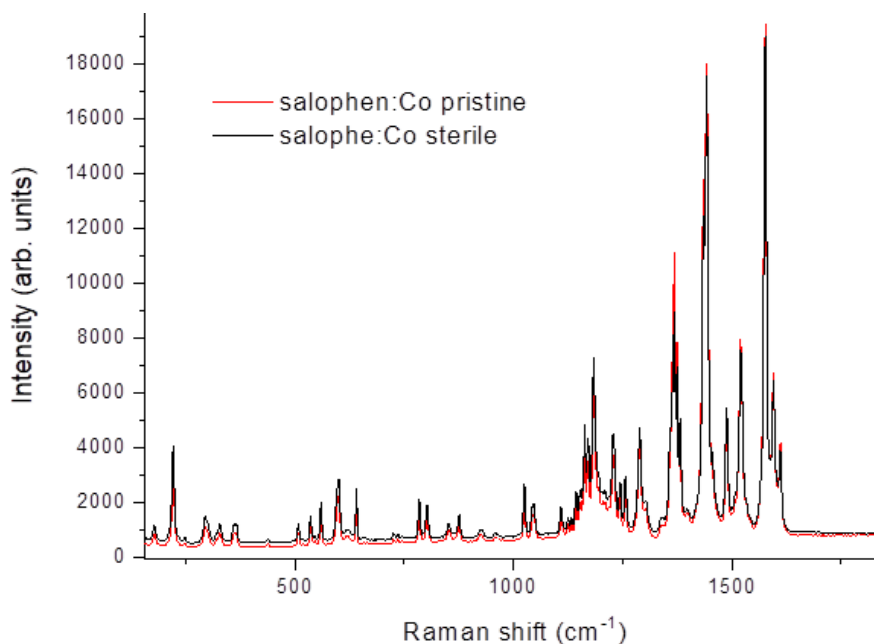


Figura 8 espectro Ramam do complexo de cobalto pré e pós esterilização por autoclave.

5.3 Determinação da atividade antimicrobiana

5.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (Laboratório de Biotecnologia Microbiana).

Foram testadas várias diluições a partir de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do ligante livre e os complexos de cobre (II) e cobalto (II) frente a 6 cepas bacterianas para a determinação da concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima. Os resultados dos dois complexos estão expressos na tabela 1 e do ligante livre na tabela 2.

Podemos observar que os resultados mais expressivos dentre os complexos foi o cobalto para *S. aureus* com CIM de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e em seguida para *M. luteus* e *B. subtilis* com uma CIM de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM >1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Obteve-se bons resultados com o salofen frente as cepas testadas. Os mais expressivos foram para *S. aureus* e *M. luteus* com uma CIM de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos complexos de cobre (II) e cobalto (II) contra bactérias patogênicas

Bactéria	CIM (Cu) µg.mL⁻¹	CBM (Cu) µg.mL⁻¹	CIM (Co) µg.mL⁻¹	CBM (Co) µg.mL⁻¹
<i>B. subtilis</i> (ATCC 21332)	>1000	>1000	500	>1000
<i>M. luteus</i> (ATCC 4698)	>1000	>1000	500	>1000
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>1000	>1000	1000	>1000
<i>P. gingivalis</i> (ATCC 49417)	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> (ATCC 8095)	>1000	>1000	250	2000
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	>1000	>1000	1000	>1000
<i>S. entérica</i> (ATCC 13076)	>1000	>1000	>1000	>1000

Tabela 2 Atividade antimicrobiana do ligante livre Salofen contra bactérias patogênicas

Bactéria	CIM (salofen) µg.mL⁻¹	CBM (salofen) µg.mL⁻¹
<i>B. subtilis</i> (ATCC 21332)	125	>2000
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	125	2000
<i>M. luteus</i> (ATCC 4698)	125	500
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	500	2000
<i>Salmonella</i> (ATCC 13076)	125	1000
<i>S. aureus</i> (ATCC 8095)	125	500

5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (LaMiB)

Foram realizados os testes para detecção da CIM dos complexos de cobre e cobalto sobre 10 cepas bacterianas. Os resultados menos expressivos estão descritos na tabela 3 e os mais expressivos estão representados na figura 9.

Tabela 3 Atividade antimicrobiana dos complexos de cobre (II) e cobalto (II) contra bactérias patogênicas (LaMiB).

Bactéria	CIM (Cu) µg.mL ⁻¹	CBM (Cu) µg.mL ⁻¹	CIM (Co) µg.mL ⁻¹	CBM (Co) µg.mL ⁻¹
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>C. freundii</i>	1000	>1000	>1000	>1000
<i>Pseudomonas spp</i>	1000	>1000	>1000	>1000
<i>Salmonella spp</i>	>1000	>1000	>1000	>1000

O complexo de cobalto se mostrou mais eficaz quando comparado ao complexo de cobre, porém para *E. coli*, *P. aeruginosa* spp, *S. setubal* e *C. freundii*, ambos não demonstraram efeitos significativos apresentando CIM acima de 1000 µg.ml⁻¹.

Observa-se na figura 9 que o complexo de cobalto inibiu acima de 80% em todas as concentrações testadas contra o *S. aureus*; acima de 70% até 125 µg.mL⁻¹, e acima de 65% na concentração de 62,5 µg.mL⁻¹ para *S. epidermidis*. Em relação *S. saprophyticus*, teve morte celular ao acima de 75% nas menores concentrações, chegando em aproximadamente 95% de inibição nas maiores concentrações; para *E. faecalis* as inibições ficaram acima de 90% até a menor concentração; para *M. luteus* as inibições ficaram acima de 86% na menor concentração chegando a 95% nas maiores concentrações; *B. subtilis* foi inibido em 85% na menor concentração e chegou em 95% para as maiores concentrações.

As concentrações de 125 e 62,5 µg.mL⁻¹ mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com a penicilina/estreptomicina para todas as bactérias testadas.

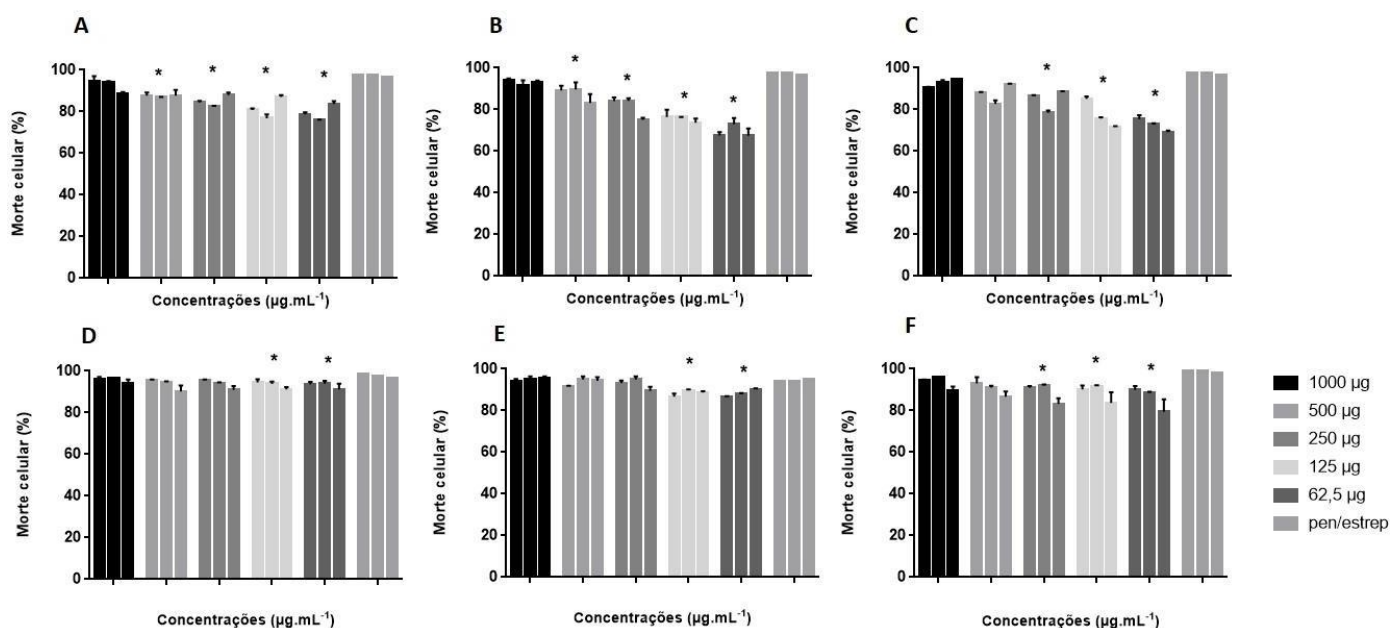


Figura 9. Porcentagem de inibição bacteriana após 24 horas de exposição ao complexo de cobalto. A) *S. aureus*, B) *S. epidermidis*, C) *S. saprophyticus*, D) *E. faecalis*, E) *M. luteus* e F) *B. subtilis*. * P<0,05 vs Pen/Estrep.

5.3.3 Determinação da Concentração Bactericida mínima (LaMiB)

Após a determinação da CIM, as alíquotas foram retiradas para a realização da CBM. Foram demonstrados na figura 10 os melhores resultados e os menos expressivos estão demonstrados na tabela 3. Podemos observar que a CBM para *S. aureus* é de 1000 µg.mL⁻¹, para *S. epidermidis* é de 250 µg.mL⁻¹, para *S. saprophyticus* e *E. faecalis* é de 500 µg.mL⁻¹, e para *M. luteus* e *B. subtilis* são necessários mais testes com menores concentrações pois até onde foi testado não houve crescimento bacteriano.

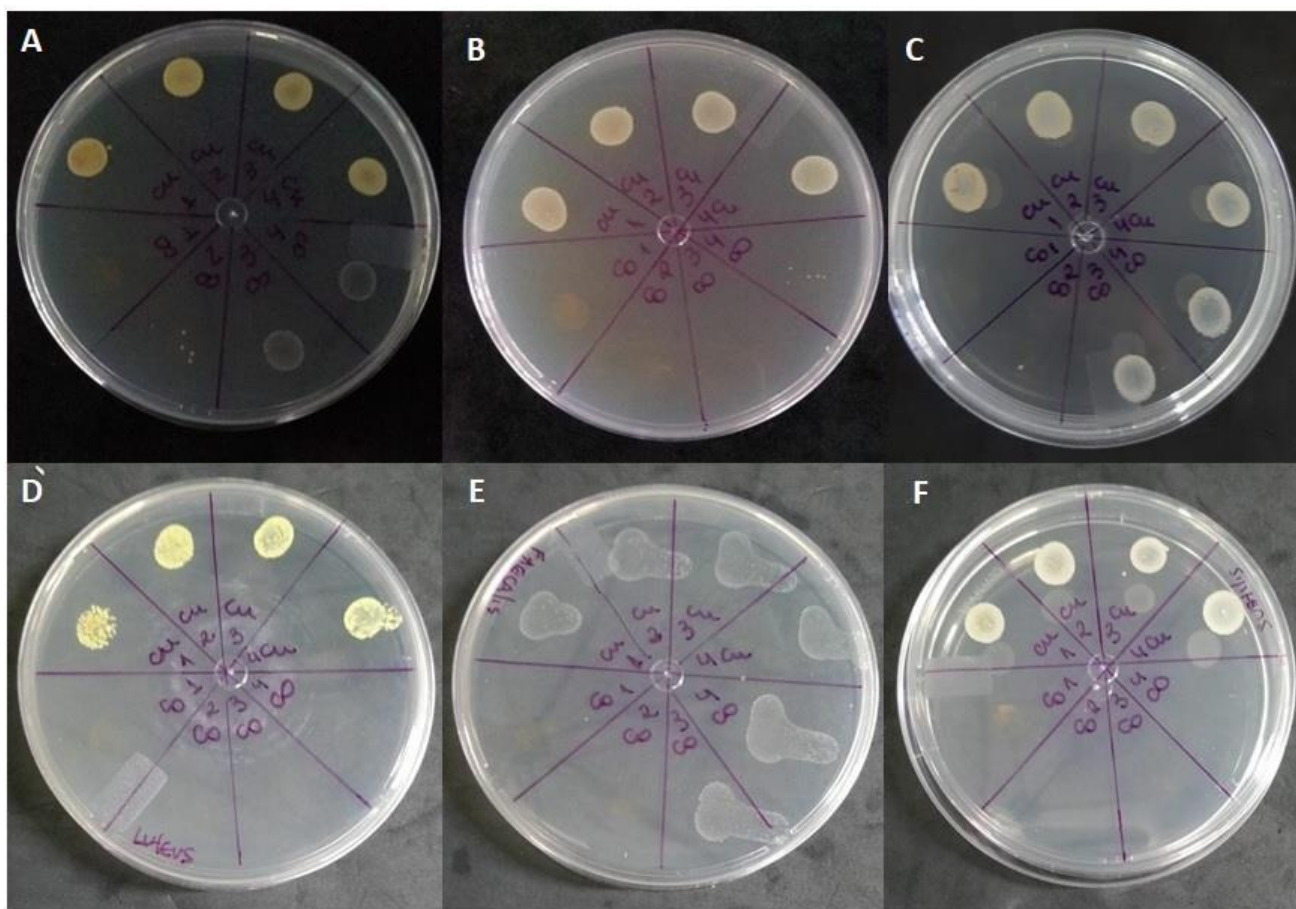


Figura 10. Placas demonstrando a CBM sendo A) *S. aureus*, B) *S. epidermidis*, C) *S. saprophyticus*, D) *M. luteus*, E) *E. faecalis*, F) *B. subtilis*

5.3.4 Curva de sobrevivência (Time Kill)

A figura 11 representa a curva de sobrevivência da bactéria *S. aureus* (ATCC 8095) quando exposto ao ligante livre salofen utilizando-se a concentração de CIM e CBM. A curva controle demonstra o crescimento natural do microrganismo sem ação de tratamentos. Para a curva CIM observamos que até 10 horas a concentração celular se manteve, após esse período houve um leve crescimento e, após 16 horas houve uma queda das células bacterianas.

Referente a curva da concentração de CBM, observamos que em aproximadamente 5 horas de exposição ao composto, a quantidade de células bacterianas começou a cair e em aproximadamente 8 horas houve 100% de morte.

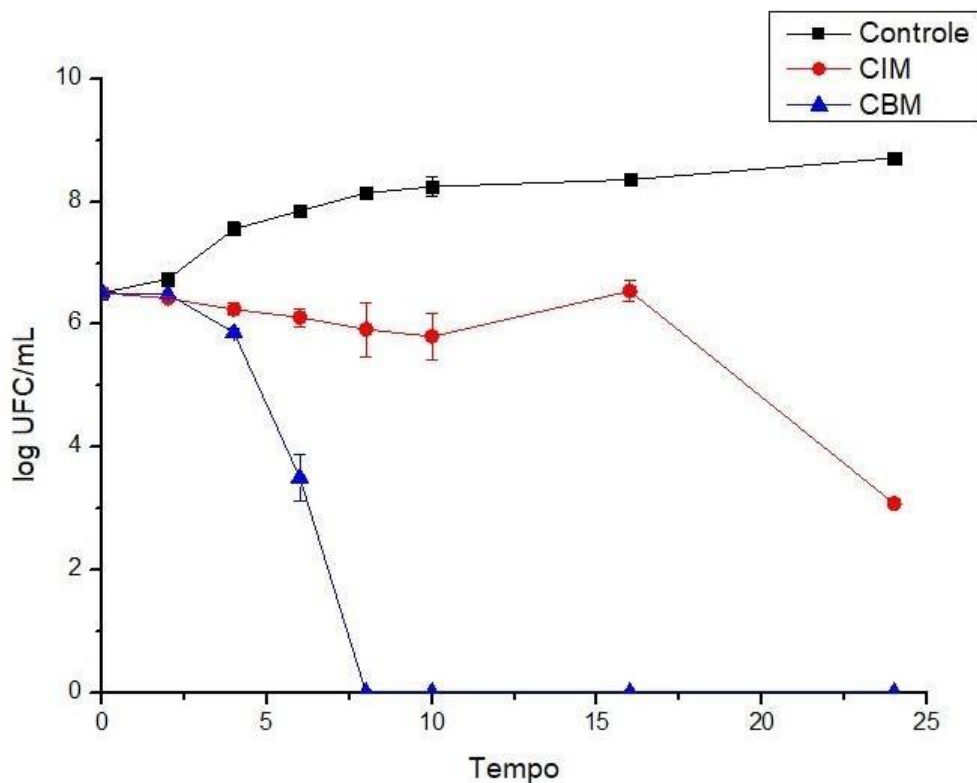


Figura 11 Ensaio *Time Kill* do ligante livre Salofen frente a *S. aureus* (ATCC 8095) em 24 horas. Os experimentos são expressos como a média e o desvio padrão de três amostras independentes

A figura 12 representa a curva de sobrevivência do *S. aureus* (ATCC 8095) quando exposto ao complexo de cobalto utilizando-se a concentração de CIM e CBM. A curva controle demonstra o crescimento natural do microrganismo sem ação de tratamentos. A curva controle de DMSO demonstra que a concentração utilizada para diluição dos complexos não age sobre o microrganismo pois a curva está acompanhando o controle de crescimento. Para a curva CIM obtivemos o resultado esperado, onde ela se mantém durante as 24 horas, demonstrando que o complexo inibiu totalmente o crescimento bacteriano. Na curva CBM podemos notar a queda total próximo a 15 horas, ou seja, a partir deste período o complexo demonstra sua ação bactericida.

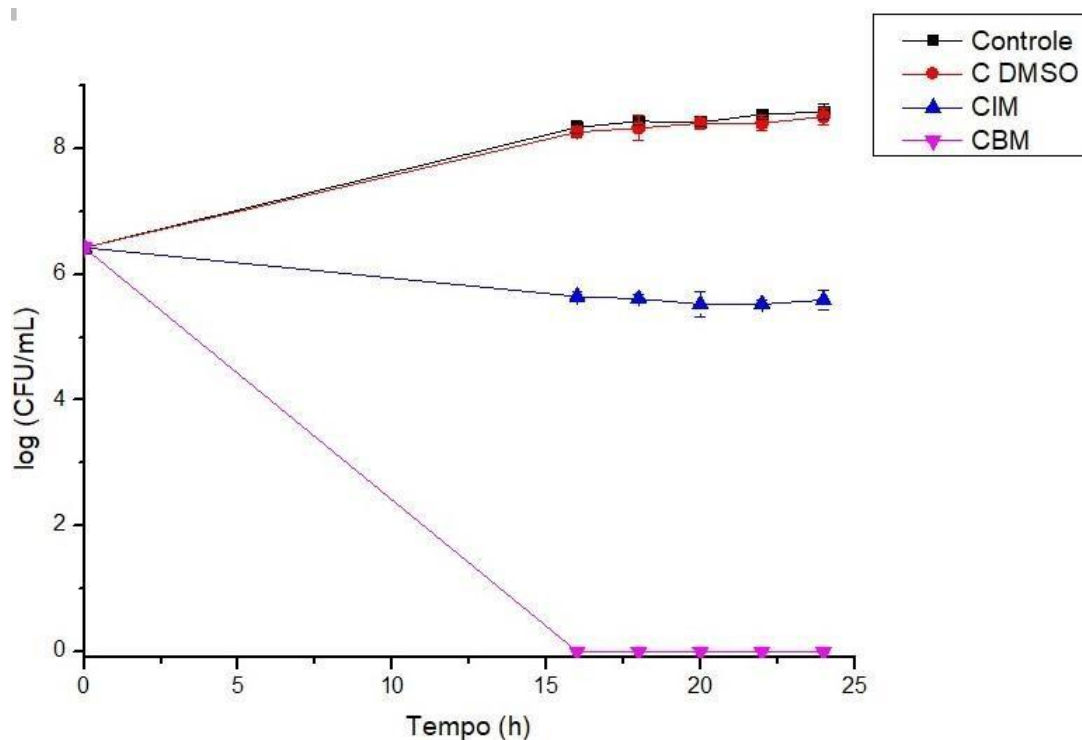


Figura 12. Ensaio *Time Kill* de complexo de cobalto frente a *S. aureus* (ATCC 8095) em 24 horas. Os experimentos são expressos como a média e o desvio padrão de três amostras independentes.

A figura 13, representa a curva de sobrevivência de *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* quando expostos ao complexo de cobalto nas concentrações de CIM e CBM. A partir dos gráficos, podemos observar para as três bactérias, que na concentração de CIM não houve crescimento bacteriano em 24 horas e para a concentração de CBM, observou-se a queda celular em aproximadamente 12 horas para *E. faecalis*, 12 horas para *S. aureus* e 16 horas para *S. epidermidis*.

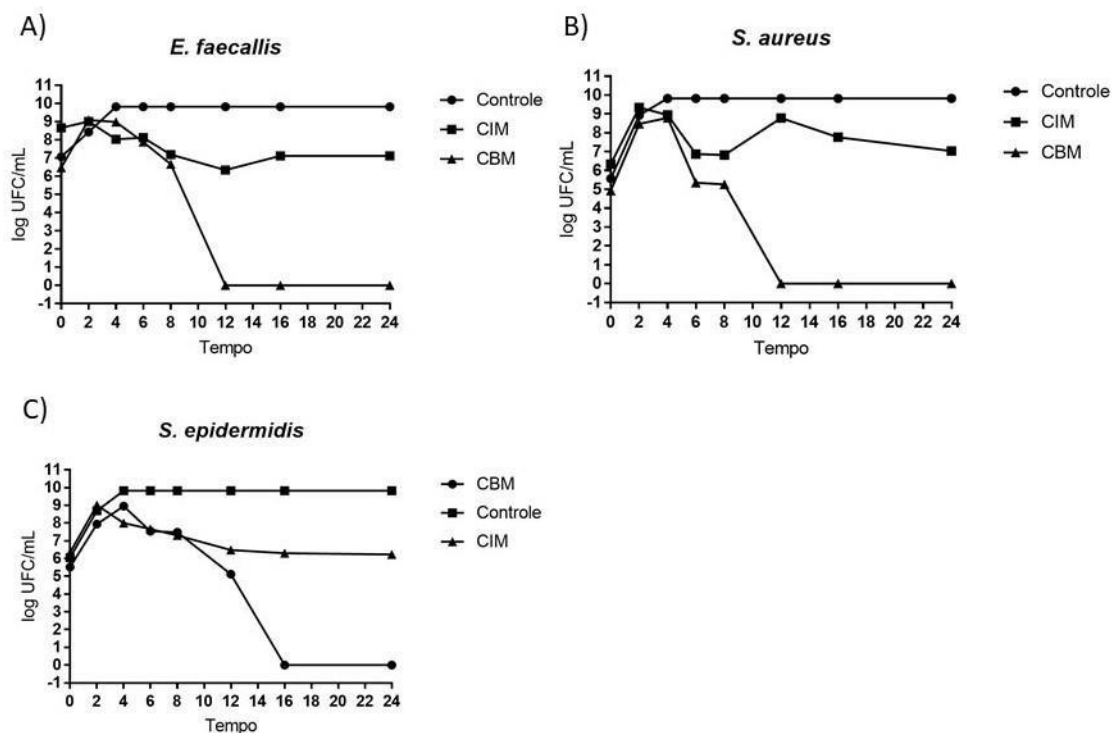


Figura 13. Ensaio *Time Kill* de complexo de cobalto frente a A) *E. faecalis*. B) *S. aureus* (ATCC 6538) e C) *S. epidermidis* em 24 horas.

5.3.5 Modulação da atividade de antibióticos

Os valores determinados neste teste de CIM dos antibióticos e CIM da combinação de antibiótico e salofen estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do salofen livre isolado e em associação com amicacina e gentamicina sobre *S. aureus* (ATCC 6538)

	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1)	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1) Combinado	CIF	Interpretação
Amicacina	32	0,25	0,007	Sinérgico
Gentamicina	4	0,25	0,06	Sinérgico

Ao observarmos os valores de CIM combinado, podemos constatar que a associação de ambos os antibióticos ao salofen apresentou modulação significativa da CIM quando comparado a CIM isolada e ao realizar o cálculo de CIF determinou-se atividade sinérgica do salofen aos dois antibióticos.

5.4 Determinação da Atividade Leishmanicida

Podemos observar na figura 14, que para o complexo de cobalto as concentrações de 2000, 1000 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mataram aproximadamente 90% dos indivíduos de *Leishmania*. A partir de 250 houve uma queda significativa na ação do composto e a morte ficou abaixo de 30%.

A ação do complexo de cobre demonstrou diferença maior entre os horários quando comparado ao complexo de cobalto. A morte celular ficou entre 20 e 40% em 24 horas e em 48 horas nas concentrações de 2000 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ficou entre 80 e 95%. Nas três últimas concentrações testadas, obteve-se morte celular entre 25 e 45%.

As diferenças estatísticas foram calculadas através da comparação das concentrações e todas demonstraram diferenças estatísticas exceto 1000 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no complexo de cobalto.

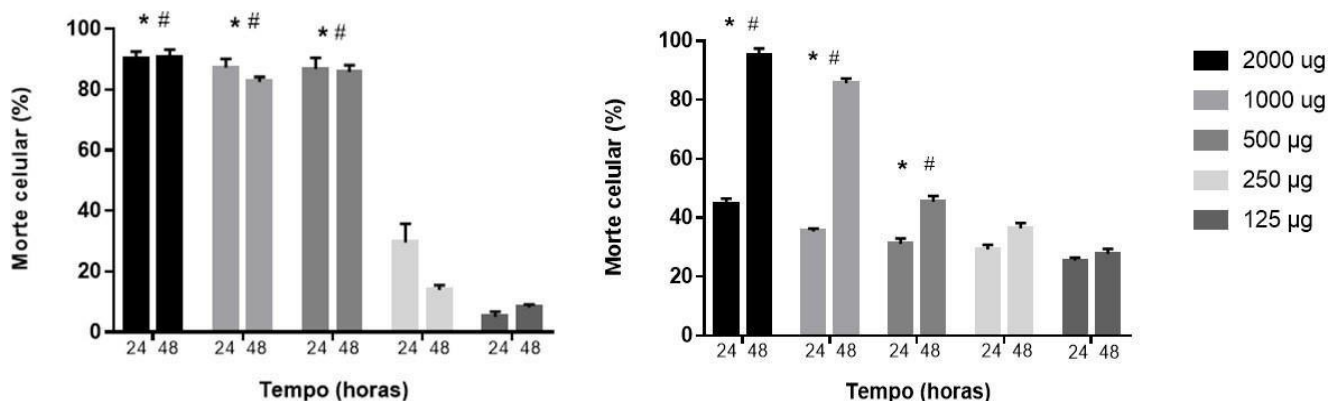


Figura 14. Morte celular após 24 e 48 horas de exposição dos complexos de cobalto e cobre sobre *L. infantum chagasi*, sendo A) Complexo de cobalto e B) Complexo de cobre. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs (250 μg); # $P < 0,05$ vs (125 μg).

5.5 Determinação da Citotoxicidade

Observa-se na figura 15 que o ligante livre demonstrou menos toxicidade sobre os fibroblastos (HFF-1) quando comparado aos complexos sendo a última concentração de $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com viabilidade celular de aproximadamente 60% em todos os tempos testados.

O complexo de cobalto demonstrou assim como o ligante livre, uma toxicidade dose dependente, ou seja, ao diminuir a concentração a viabilidade celular aumenta. Chegando em média a 40% na concentração de $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O complexo de cobre apresenta resultados parecidos ao complexo de cobalto, porem o que difere é que mesmo na menor concentração nos tempos de 48 e 72 horas a viabilidade celular obteve uma média de 30%.

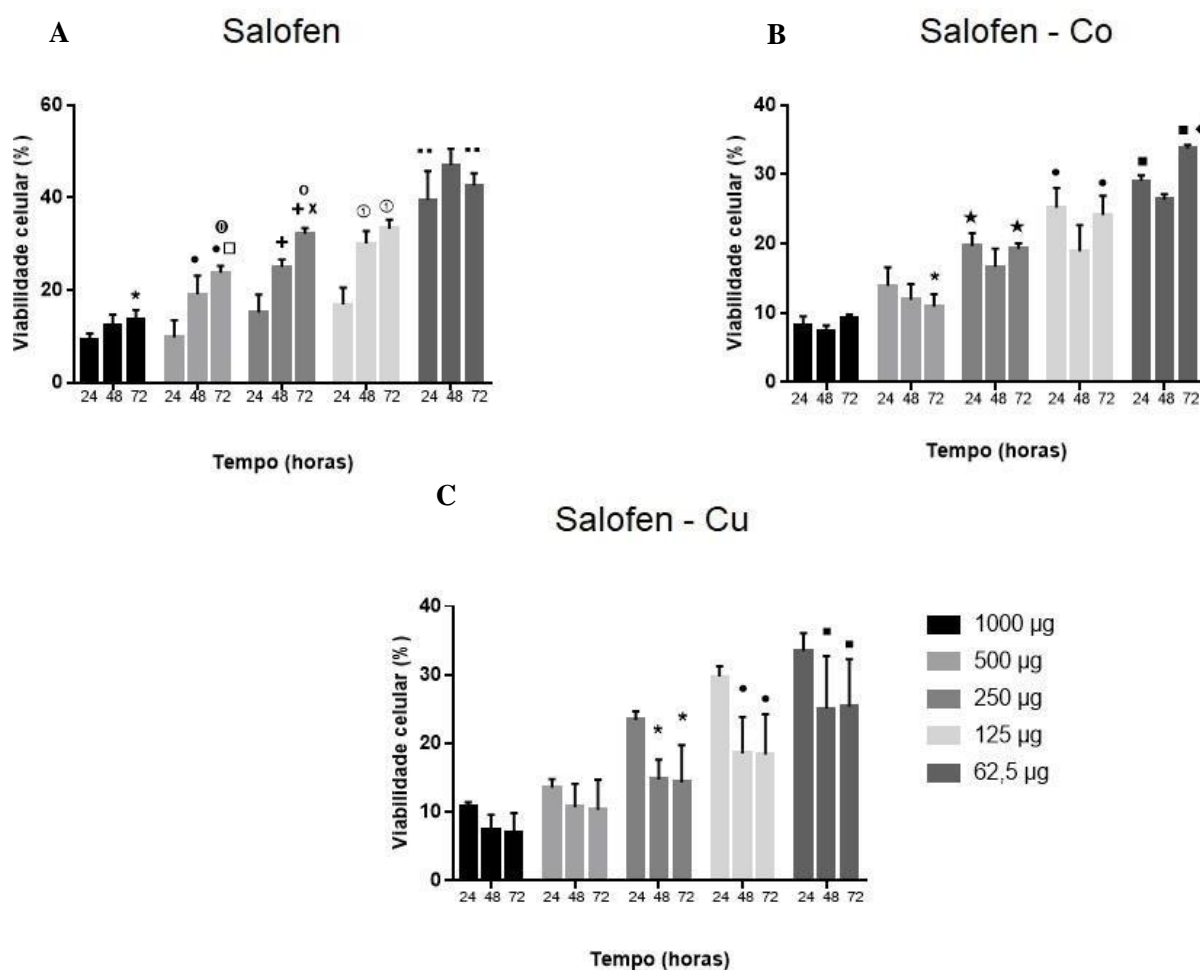


Figura 15. Viabilidade celular de HFF-1 (fibroblastos) após exposição ao ligante livre e seus complexos em 24, 48 e 72 horas, sendo A) dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs 24h (1000 μg); • $P < 0,05$ vs 24h (500 μg); □ $P < 0,05$ vs 24h (500 μg); ⊙ $P < 0,05$ vs 48h (500 μg); + $P < 0,05$ vs 24h (250 μg); x $P < 0,05$ vs 24h (250 μg); ⊙ $P < 0,05$ vs 48h (250 μg); ① $P < 0,05$ vs 24h (125 μg); ② $P < 0,05$ vs 48h (62,5 μg). B) Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs 24h (500 μg); ★ $P < 0,05$ vs 48h (250 μg); • $P < 0,05$ vs 48h (125 μg); ▣ $P < 0,05$ vs 48h (62,5 μg); ♦ $P < 0,05$ vs 24h (62,5 μg). C) Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs 24h (250 μg); • $P < 0,05$ vs 24h (125 μg); ▣ $P < 0,05$ vs 24h (62,5 μg).

Já na figura 16, podemos observar a viabilidade celular de uma outra linhagem de fibroblasto (HDFn) frente ao ligante livre em 24, 48 e 72 horas. A concentração de 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ demonstrou uma toxicidade maior. Já as concentrações de 125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 62,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ observou-se uma toxicidade bem menor. A porcentagem de viabilidade celular nos três horários, ficou acima

de 70% para as duas últimas concentrações testadas, o que é um resultado promissor.

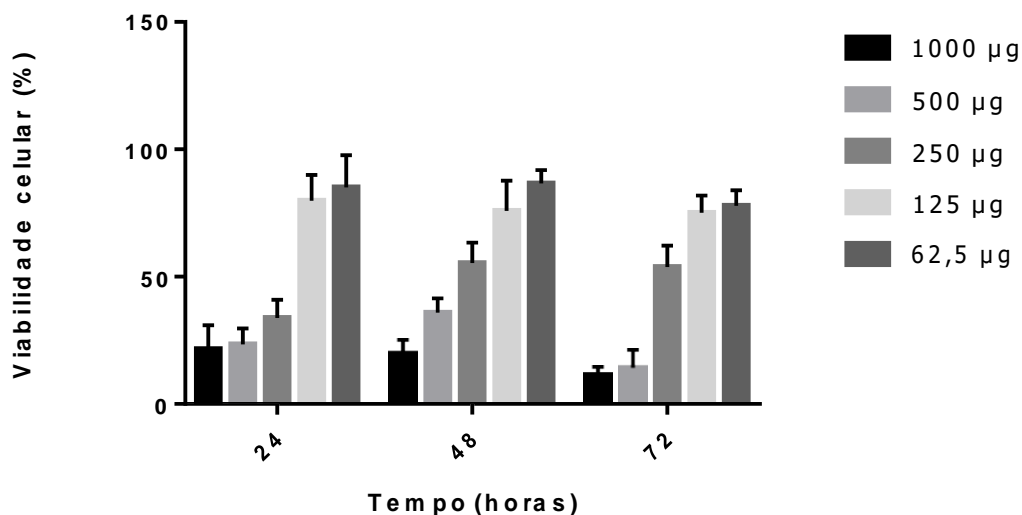


Figura 16. Viabilidade celular de HDFn (fibroblastos) após exposição ao ligante livre em 24, 48 e 72 horas, sendo A) dados apresentados como média \pm desvio padrão

Na figura 17, podemos observar a viabilidade celular de queratinócitos (HaCat) frente ao ligante livre em 24, 48 e 72 horas. Os resultados são semelhantes aos da linhagem HDFn, onde, a concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrou uma toxicidade maior e a concentração de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrou uma toxicidade menor. Em $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a porcentagem de viabilidade celular nos três horários, ficou acima de 80%.

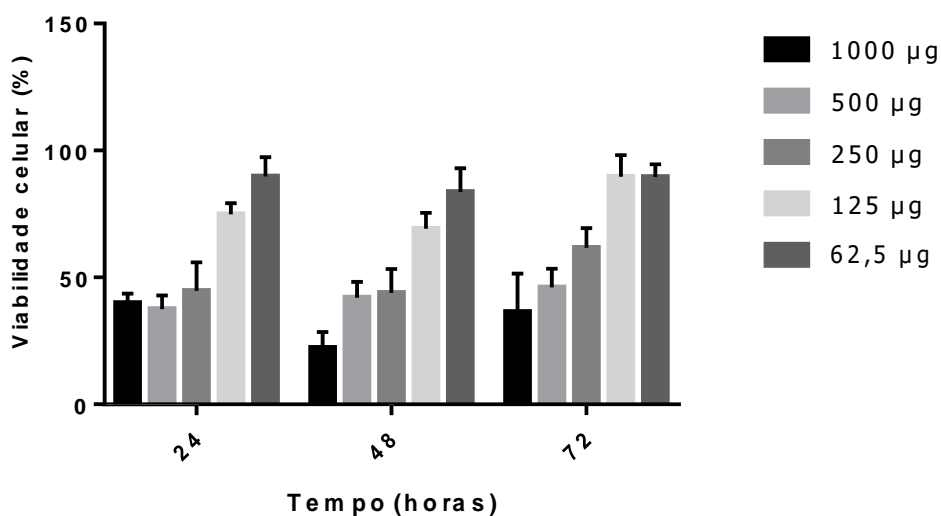


Figura 17 Viabilidade celular de HaCat (queratinócitos) após exposição ao ligante livre em 24, 48 e 72 horas, sendo A) dados apresentados como média \pm desvio padrão

A figura 18 apresenta microfotografias do teste de viabilidade celular as 72 horas de fibroblastos HFF-1 frente ao ligante livre nas concentrações de 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pode-se observar através da morfologia quando comparada ao controle que nas duas últimas concentrações os fibroblastos mantiveram sua característica fibroblástica estrelada apesar de ser possível detectar alterações morfológicas. Em 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nota-se que as células estão prestes a desaderir da superfície de adesão adquirindo a característica arredondada.

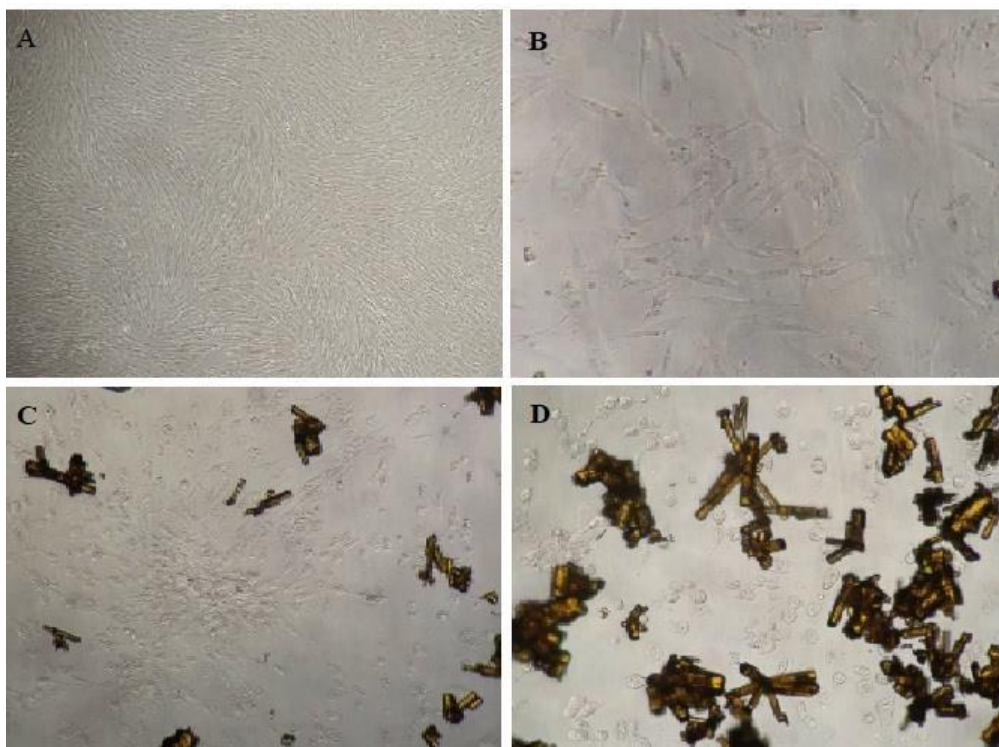


Figura 18. Microscopia óptica da ação do ligante livre sobre fibroblastos (HDF-1) em objetiva de 40X sendo A) controle de crescimento, B) concentração de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, C) concentração de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e D) concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.6 Avaliação intracelular da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

A figura 19 mostra a produção de EROs avaliada no sobrenadante celular das células HaCaT, após exposição de 72 horas ao ligante livre Salofen e o complexo de cobalto. Podemos observar um aumento significativo para todas as concentrações testadas dos dois compostos em relação ao controle negativo, porém, as células expostas ao ligante livre, principalmente na menor concentração de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o perfil de produção de EROs mais próxima ao controle negativo.

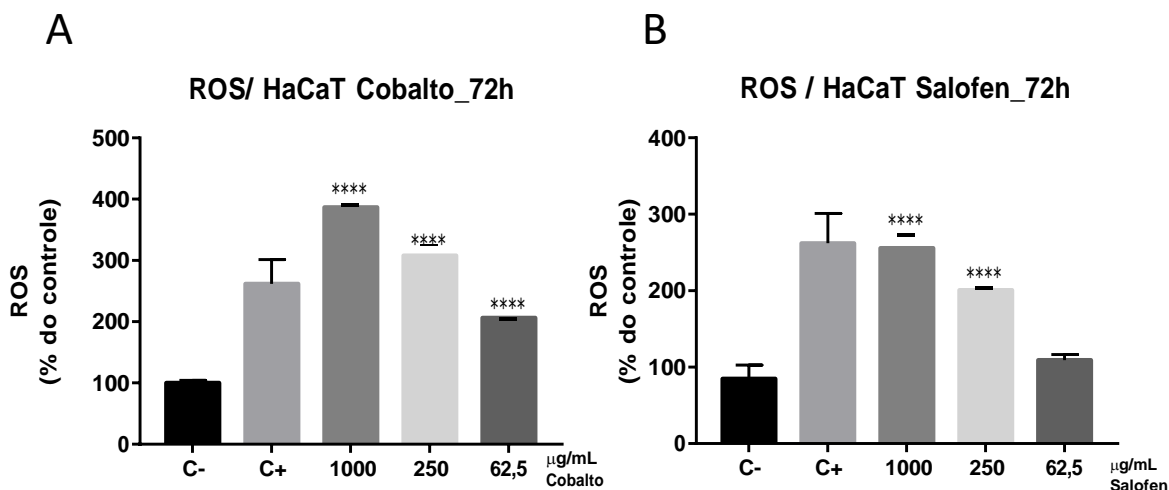


Figura 19 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) através da sonda DCFH-DA para queratinócito (HaCaT) após exposição de 72 horas aos compostos, sendo: A) Exposição ao complexo de cobalto e B) Exposição ao ligante livre Salofen. Controle negativo (C-) (células + meio de cultura); Controle Pósitivo (C+) (Células + 1µm de H₂O₂). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes. A análise foi realizada pelo teste paramétrico One way ANOVA e pós-teste de Dunnett's. O símbolo **** p < 0,0001 representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos expostos aos compostos quando comparado ao grupo C-.

5.7 Migração celular

A partir dos resultados obtidos através dos testes de migração celular pudemos observar se as células migram ou não e em quanto tempo elas fecham o risco feito no primeiro dia de experimento após a exposição as diferentes concentrações dos compostos.

A figura 20 mostra os registros da migração celular dos queratinócitos HaCat frente as diferentes concentrações do ligante livre salofen. A partir das imagens podemos destacar que o o grupo controle fechou totalmente em 48 horas e as concentrações de 62,5 e 125 µg.mL⁻¹ seguiram o mesmo padrão, desta forma as células mantiveram a sua taxa de crescimento mesmo em exposição aos tratamentos nestas concentrações. Na concentração de 250 µg.mL⁻¹ elas migraram totalmente em 72 horas e nas concentrações de 500 e 1000 µg.mL⁻¹ os tempos avaliados não foram suficientes para elas migrarem totalmente.

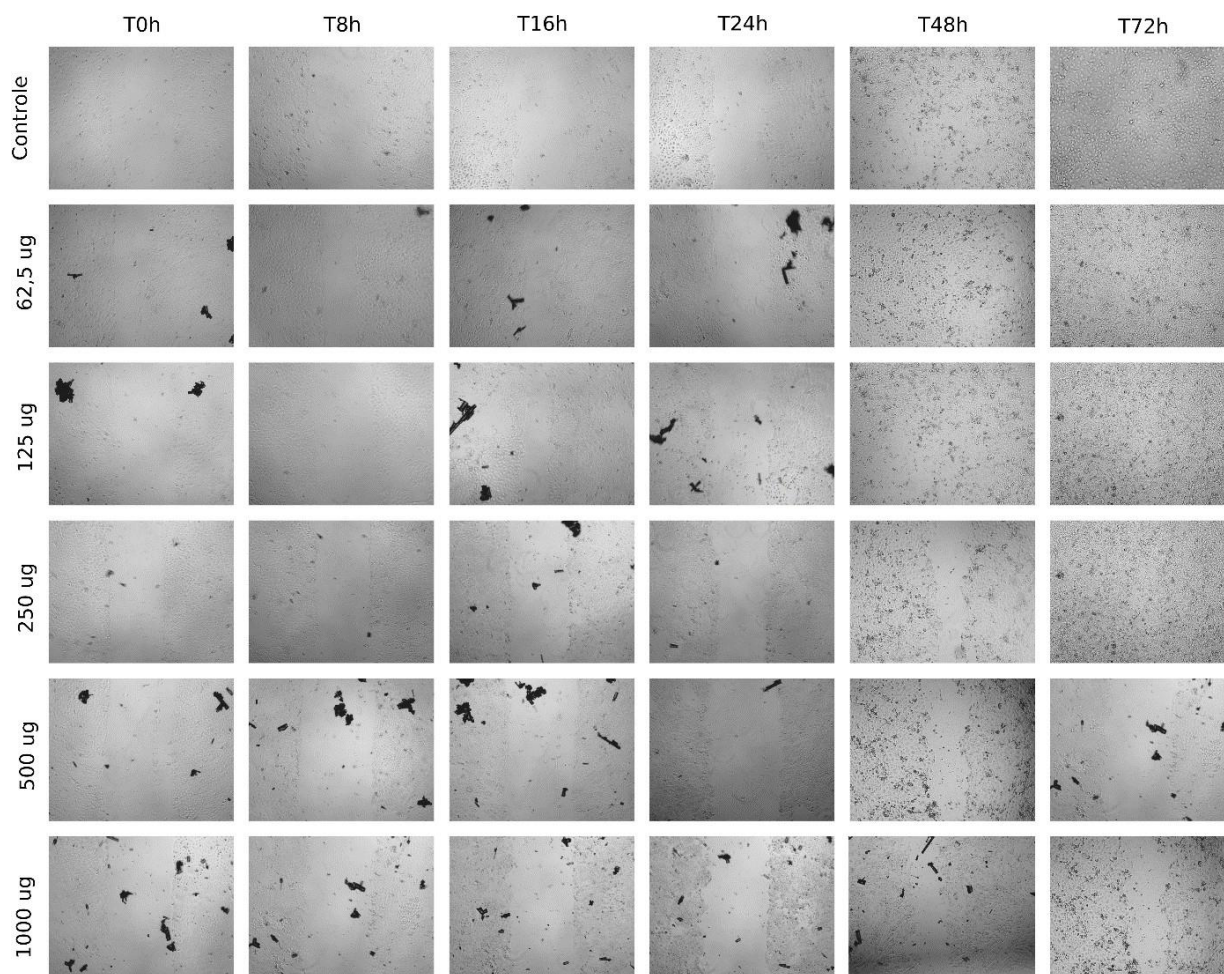


Figura 20 Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao ligante livre salofen em diferentes concentrações.

A figura 21 mostra os registros da migração celular dos queratinócitos HaCat frente as diferentes concentrações do complexo de cobalto. Podemos observar que o risco fechou completamente em 48 horas no grupo controle e quando expostas as concentrações de 62,5, 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o risco fechou totalmente em 72 horas. Nas maiores concentrações de 500 e 1000 as 72 horas também não foram suficientes para elas migrarem totalmente, apesar de verificar que ocorreu migração, porém não o suficiente para fechar o risco.

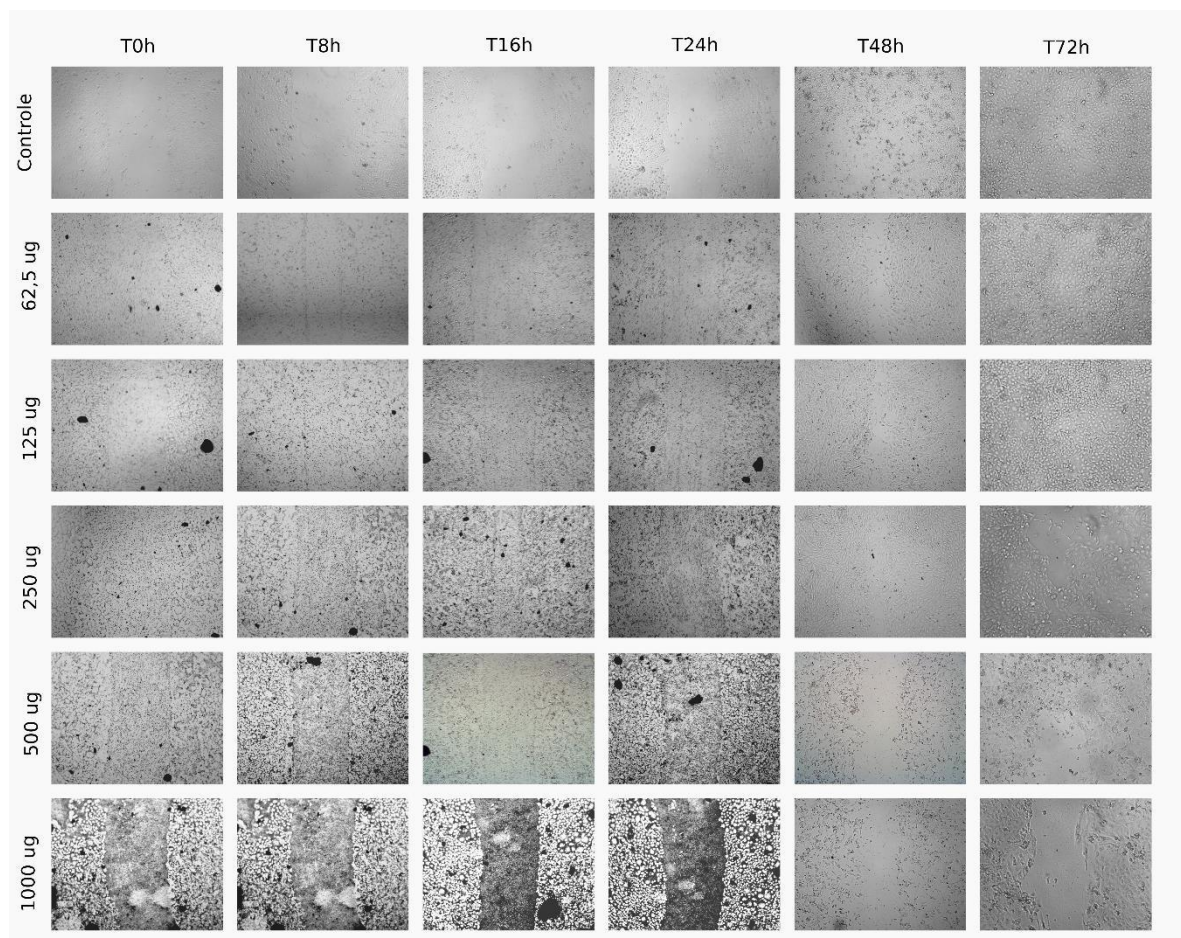


Figura 21 Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao complexo de Co em diferentes concentrações.

A figura 22 mostra os registos da migração celular dos fibroblastos HDFn frente as diferentes concentrações do ligante livre salofen. O grupo controle fechou totalmente em 48 horas e as concentrações de 62,5 e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstraram o mesmo padrão, fechando completamente em 48 horas. A concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não fechou completamente, mas foi possível verificar que houve uma migração celular significativa. Nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ este tempo não foi suficiente para observar uma migração celular significativa.

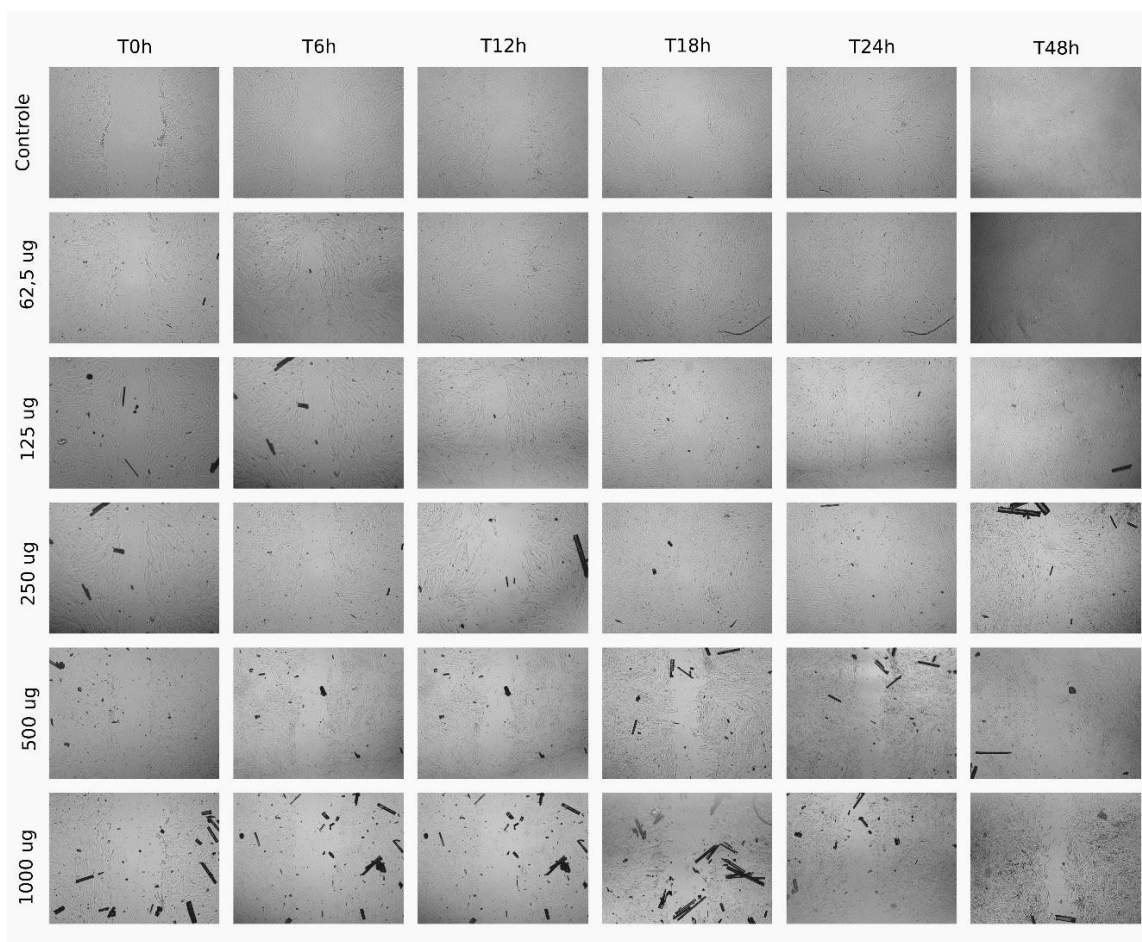


Figura 22 Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HDFn frente ao ligante livre salofen em diferentes concentrações.

6. DISCUSSÃO

Os complexos metálicos possuem diversas vantagens para o desenvolvimento de fármacos como por exemplo uma grande variedade de estados de oxidação acessíveis em sistemas biológicos, simplicidade na síntese e possibilidade de substituição de ligantes. A partir disto, a ciência desenvolve complexos metálicos para tratamento de várias doenças como úlceras de estômago com compostos de bismuto (GASSER; METZLER-NOLTE, 2012), diabetes com vanádio (THOMPSON; ORVIG, 2000), artrite reumatoide com ouro (BERTRAND; CASINI, 2014), antimicrobianos com prata (MARKOWSKA, et al 2015), antimalaria com o ferro (BARRY; SADLER, 2013) e anticâncer com platina (MEDICI, et al 2015; APPELT, 2017).

Para determinar as características estruturais das bases de Schiff podem ser utilizadas várias técnicas, em geral, as amostras têm suas estruturas determinadas por difração de raios X, pois trata-se de uma técnica simples e muito eficiente (SANTOS, 2017).

Os efeitos biológicos da base livre e complexada que foram estudadas neste trabalho, podem ser explicados em parte pelas semelhanças e diferenças encontradas nos difratogramas obtidos pela técnica de raio X. Por exemplo, o complexo de cobre apresenta atividade biológica menos expressiva que o complexo de cobalto e que a base livre, sendo que estes últimos apresentam estruturas muito parecidas já no complexo com cobre diferenças substanciais foram encontradas.

Uma outra técnica utilizada para contribuir com a caracterização física, foi a espectroscopia Ramam. Em um primeiro momento, para a interpretação dos espectros Ramam, é observado a presença de bandas características de grupos funcionais mais comuns como por exemplo C=O (1800 a 1650 cm^{-1}), OH (3500 a 3200 cm^{-1}), C-O (1300 a 1000 cm^{-1}), N-H (3400 a 3200 cm^{-1}), C-H (3200 a 2800 cm^{-1}), =C-H (3100 a 3000 cm^{-1}) e C=C (1650 a 1450 cm^{-1}) (HAACK, 2015). Por todos estes motivos e todas as vantagens demonstradas, foi realizado a espectroscopia Ramam e a difração de raios x para a caracterização física dos materiais e em seguida a realização das análises biológicas.

A técnica de espectrofotometria Raman permite obter informações particulares e específicas de cada material, como uma impressão digital, sendo assim, é possível identificar a presença ou ausência de bandas características de grupos funcionais presentes em nossos compostos. Neste trabalho foram avaliados os espectros Raman do complexo com Cobalto antes e depois dos processos de esterilização por calor úmido, já que para a realização dos testes biológicos, é necessário a esterilização de todos os materiais utilizados que é feita em autoclave (121°C por 30 minutos). Neste processo o calor e a pressão poderiam modificar a estrutura de nosso material e alterar as características físico-químicas dos compostos.

Assim, é possível verificar que os picos dos espectros das amostras que não passaram pelo processo de autoclavagem e das que passaram estão na mesma posição. Se houvesse qualquer mudança das características, seria refletido na posição dos picos. Podemos observar através do estudo de Toledo (2015), que a posição dos picos Raman do Salofen livre são bastante dependentes da temperatura (TOLEDO, 2015).

O fato de termos dois espectros Raman iguais, ou seja, mesmas posições dos picos, provam que o processo de autoclavagem não induz qualquer modificação nas características físico-químicas dos materiais. Isto somado aos dados de TG, mostram que mudanças significativas acontecem apenas em temperaturas acima de 185°C (TOLEDO et al, 2015)

Para determinar o potencial antimicrobiano de diversas substâncias é necessário a utilização de ensaios que avaliem a viabilidade bacteriana após a exposição pelos compostos de interesse, sendo os mais comuns CIM, CBM, *Time Kill* e modulação de antibióticos.

De acordo com a classificação de Holetz et al (2002) os valores de CIM inferiores a 0,1 mg.mL⁻¹ representam forte ação antimicrobiana; valores entre 0,1 e 0,5 mg.mL⁻¹ indicam atividade antimicrobiana moderada, valores entre 0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹ indicam atividade antimicrobiana fraca e acima de 1,0 é ineficaz (HOLETZ et al, 2002).

Appelt (2017) testou a atividade biológica de complexos de rutênio (II) contendo ligantes tiazolinas sobre cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis* através das técnicas de MIC, CBM e *time kill*. É importante citar

que as cepas utilizadas possuem os mesmos ATCCs de nosso estudo e os resultados foram condizentes com nossos achados principalmente quando observamos os comportamentos das substâncias avaliadas em relação as bactérias Gram-positivas e negativas. Nos dois trabalhos os melhores resultados foram observados sobre as cepas Gram-positivas em especial o gênero *Staphylococcus*. *E. coli* e *P. aeruginosa* não demonstraram sensibilidade significativa com as cepas testadas na fase 1. Nos estudos feitos com as cepas da fase 2 obtivemos resultados significativos com o ligante livre frente a *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. setubal*, e *S. aureus* com MICs $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*. Outro ponto semelhante entre os estudos é com relação ao CBM. Em nossa pesquisa para *S. epidermidis* é de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o complexo [5b].PF₆ do estudo citado (APPELT, 2017).

Uma das possíveis explicações para a diferença nos padrões de atividade antimicrobiana das substâncias avaliadas nos estudos antes descritos pode ter relação com a diferenças da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nas positivas, há uma única camada espessa de peptídeoglicanos. As negativas possuem uma camada celular mais delgada e também uma segunda membrana lipídica e lipopolisacarídeos o que dificulta a penetração de drogas lipofílicas ou muito grandes (TORTORA, CASE, FUNKE 2016). Apesar disso, obtivemos resultados significativos com algumas Gram-negativas nos estudos da fase 2.

Há um fármaco chamado clofazimina, que foi sintetizada inicialmente para utilização como corante demonstrou um alto potencial contra hanseníase e há poucos relatos de resistência bacteriana referente a ele. O mecanismo de ação é desconhecido, porém sua capacidade de se ligar ao DNA do *mycobacterium leprae* pode auxiliar na atividade antimicrobiana (JUNIOR, 2018). Esta informação pode ser um indício de como as bases de Schiff agem através de ligação ao DNA bacteriano a eliminação do microrganismo.

O teste *time kill* é utilizado para determinar o tempo necessário para um composto impedir o desenvolvimento ou matar um microrganismo. A CIM é uma medição estática e pontual e as curvas de *time kill* fornecem o perfil da atividade antimicrobiana ao longo do tempo, ou seja, oferece informações sobre a

extensão da morte além de possivelmente detectar a presença de subpopulações resistentes (NETA et al, 2016).

Ainda sobre o estudo de Neta e colaboradores (2016), testaram a atividade antimicrobiana de β -cariofileno e do óleo essencial de Jessina Laranja e utilizaram a técnica de *time kill* e os resultados mais expressivos também foram para bactérias Gram-positivas, reduzindo a população de *S. aureus* em 4 horas e 12 horas para *E. faecalis*. As concentrações testadas foram de 2,0 mg.mL⁻¹, ou seja, mesma concentração utilizada em nosso trabalho (NETA et al, 2016).

Obtivemos bons resultados com as curvas de *Time Kill*, porém o resultado mais significativo foi com a bactéria *S. aureus* frente ao ligante livre Salofen, onde a queda da curva foi em 8 horas de exposição. Após este tempo não houve qualquer crescimento bacteriano.

A alternativa de reavivar drogas que estão inativas em consequência da resistência microbiana, pode ser alcançada inibindo a expressão de diversos mecanismos de resistência e segundo Garza-Cervantes e colaboradores (2020), uma estratégia para conquistarmos a volta da utilização destas drogas, seria a formulação de íons metálicos de transição combinados a antibióticos (GARZA-CERVANTES et al, 2020).

Com relação a atividade modulatória, foram feitos testes preliminares com o ligante livre e dois antibióticos, sendo eles amicacina e gentamicina. A partir dos testes observou-se um resultado satisfatório e reduziram a CIM significativamente em até 14X para amicacina e 8X para gentamicina e a partir do cálculo de CIF detectamos efeito sinérgico do salofen. É importante lembrar que se deve utilizar uma concentração subinibitória do composto para evitar resultados falso positivos (STRAVI, 2007).

O estudo com resultados semelhantes de Cirino (2014) determinou a atividade modulatória de diversos óleos essenciais e terpenóides e todos eles modificaram a atividade antibiótica, modulando entre 2 à 16X, ou seja, apesar de serem compostos diferentes, demonstraram bons resultados na associação com antibióticos (CIRINO, 2014).

Alencar e colaboradores (2015) analisou a atividade moduladora de extratos de *S. purpúrea* e *S. mombin* frente a *S. aureus* em relação ao perfil de resistência a eritromicina. A associação de *S. purpúrea* com a eritromicina

apresentou efeito sinérgico com duas cepas de *S. aureus* e o efeito mais expressivo foi onde a CIM foi reduzida de 26,04 para 1,46 mg.mL⁻¹ apresentando um CIF de 0,06. Pode-se observar que o resultado de CIF é igual ao encontrado por nós para gentamicina, porem nosso melhor resultado demonstrou um CIF de 0,007 para amicacina (ALENCAR et al, 2015).

Ainda sobre o estudo de Garza-Cervantes e colaboradores (2020) citado anteriormente, foi apresentado bons resultados com relação a associação dos compostos aos antibióticos. Eles testaram a associação de íons metálicos (Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺) e antibióticos comerciais (ampicilina e canamicina) contra *E. coli* e *S. aureus* obtendo resultados significantes. Eles notaram que a concentração inibitória mínima dos íons metálicos e antibióticos diminuiu significativamente. O mesmo ocorreu em nosso estudo, onde pudemos observar que quando associamos o ligante livre salofen aos antibióticos amicacina e gentamicina, diminuimos a CIM significativamente. Eles demonstraram que estes tratamentos combinatórios podem eliminar infecção tópica murina causada por cepa resistente a antibiótico através de testes *in vivo* (GANZA-CERVANTES et al, 2020).

Além das pesquisas para determinação da atividade farmacológica, é necessário, para desenvolver um fármaco, o estudo da citotoxicidade do mesmo. Ambos são importantes para determinar seu potencial e segurança (WILSON, 2000).

Dhayabaran e colaboradores (2016) estudaram complexos de bases de Schiff derivados de histidina e 1,3-indandiona e sua ação em bactérias e fibroblastos. A técnica utilizada por eles para determinar a atividade antimicrobiana foi a difusão em disco e por isso os resultados são expressos em milímetros. Entretanto os dados corroboram com este trabalho ao observarmos que *B. subtilis* é totalmente susceptível a todos os complexos e *E. coli* não demonstra boa sensibilidade. Eles indicam também que os complexos possuem atividade antimicrobiana mais alta comparado ao ligante livre. Segundo Chohan e colaboradores (2010), há a hipótese de que o aumento da atividade antimicrobiana dada pela coordenação de metais, ocorra, provavelmente devido a presença de um sistema de doação de elétrons presentes em compostos coordenados. Estes grupos de doadores e de realocação de elétrons no quelato

reduzem a polaridade do metal complexado. O processo de quelação aumenta a lipofilicidade do átomo de metal central o que favorece a penetração do complexo através da camada lipídica da membrana do microrganismo (CHOHAN et al, 2010; DAYABARAN et al, 2016).

Ainda sobre o estudo de Dayabaran e colaboradores (2016), foi testada a citotoxicidade do ligante livre e dos complexos em células de fibroblasto de rato NIH/3T3. Eles demonstraram que o número de células diminui conforme o aumento da concentração do ligante e dos complexos, como esperado, e ao comparar o IC₅₀ a ordem de toxicidade foi zinco>ligante>níquel>cobre>cobalto. Podemos observar que os metais utilizados em comum entre os estudos (Cu e Co) demonstraram menos toxicidade e estes resultados estão coerentes aos encontrados pois a toxicidade diminui conforme diminuem as concentrações, então, podemos deduzir que este ligante e seus complexos são dose-dependentes. A diferença está no ligante livre de nossa base de Schiff que demonstrou menos toxicidade comparado aos complexos sobre fibroblastos (DAYABARAN et al, 2016).

O ensaio do MTT pode superestimar a toxicidade de certas substâncias pois ele sofre conversão enzimática em células viáveis e alguns compostos podem atuar inibindo este processo fazendo com que pareça mais tóxico do que realmente é. Outra observação é com relação a compostos coloridos que podem interferir em testes colorimétricos. Então é válido observar se os resultados utilizando o corante estão de acordo com os obtidos através da avaliação visual ou mesmo realizar outro método colorimétrico em paralelo (SMEE et al, 2002).

Em nossa observação microscópica, pudemos analisar que principalmente em relação ao ligante livre nas menores concentrações, os fibroblastos (HDF-1) mantiveram sua morfologia natural estrelada, porém nota-se que estão sofrendo algum tipo de alteração talvez por não conseguir crescer na velocidade que deveria e a observação da coloração do MTT também demonstrou viabilidade. Nas duas concentrações mais altas, as células perderam o formato estrelado, tipicamente fibroblástico e possivelmente estão prestes a morrer. Além disso, estamos analisando uma cultura 2D e talvez em uma cultura 3D ou em um organismo com todos os sistemas e tecidos organizados poderiam se comportar de maneira diferente. Contudo, é importante

salientar que os testes *in vivo* sustentam a maior fonte de informação para avaliar a segurança e eficácia dos fármacos (TIMBRELL, 2009).

Apesar dos níveis de toxicidade observados para a linhagem HFF-1é possível vislumbrar algumas alternativas que podem minimizar os efeitos de uma potencial droga contendo a base livre ou seus complexos. Assim, muitas drogas como por exemplo as quimioterápicas, possuem baixa especificidade e alta toxicidade e acabam sendo tóxicas para células saudáveis também. Esta toxicidade ocorre porque em geral os medicamentos são pequenos o suficiente para atravessar o endotélio em quase todas as regiões do organismo podendo atingir regiões saudáveis causando efeitos colaterais.

Uma possível estratégia para melhorar a toxicidade está ligada ao uso de nanopartículas coloidais, ou seja, seriam encapsulados em nanopartículas de 50-800nm e com isso não atravessariam a parede dos vasos nas regiões saudáveis pois o espaço entre as células é de 15-30nm e nas regiões doentes com por exemplo processos inflamatórios as células endoteliais são menos compactadas acumulando assim as nanopartículas. Este processo é conhecido como aprimorado de permeabilidade e retenção. A superfície de nanopartículas é totalmente modificável permitindo direcioná-la ao sítio alvo através da utilização de anticorpos, peptídeos e outros (VIEIRA, GAMARRA 2016). Esta estratégia é citada também como uma opção mais abrangente para futuros testes e possibilidades para diminuição de toxicidade e efeitos colaterais, além de aumentar a especificidade dos ligantes e seus complexos.

Em relação aos testes de MTT realizados com outra linhagem de fibroblasto (HDFn) e uma linhagem de queratinócito (HaCaT) os níveis de toxicidade foram relativamente baixos e podem ser promissores para futuros usos.

Novamente sobre o estudo de Ganza-Cervantes e colaboradores (2020), além dos testes de associação a antibióticos que corroboram aos nossos resultados, foram realizados experimentos de citotoxicidade em queratinócitos HaCaT através da técnica de MTT com os íons metálicos isolados e associados a antibióticos. Os resultados foram que Ni^{2+} não foi tóxico, Cu^{2+} e Co^{2+} exibiram viabilidade celular semelhante ao controle de crescimento, Zn^{2+} apresentou toxicidade moderada e Cd^{2+} alta toxicidade. Em nosso trabalho foi testado o

ligante livre Salofen sobre o mesmo tipo celular e nossos resultados foram promissores, principalmente nas menores concentrações testadas. A viabilidade celular ficou alta até no ultimo tempo de exposição (72 horas) (GANZA-CERVANTES et al, 2020).

Quando analisamos os resultados obtidos com os testes de MTT das duas linhagens de fibroblastos, observamos uma diferença significativa entre eles. Os compostos sobre a linhagem HDFn resistiram muito mais a exposição aos tratamentos que a linhagem HDFF-1. No estudo de Palioto e colaboradores (2016), foram comparadas características morfológicas, o potencial proliferativo e a produção proteica de fibroblastos do ligamento periodontal e de fibroblastos gengivais. Eles demonstraram que as linhagens são morfológicamente semelhantes, mas, são funcionalmente diferentes. Os do ligamento periodontal produzem grande quantidade de fosfatase alcalina (GROENEVELD; EVERTS; BEERTSEN 1994) e parecem proliferar mais rápido e sintetizar maiores quantidades de matriz extracelular quando comparados aos fibroblastos gengivais. Então foi concluído que as linhagens celulares possuem características e comportamentos distintos (PALIOTO et al, 2002).

Uma possível explicação para o fato da diferença de resistência aos tratamentos entre as duas linhagens de fibroblastos, pode estar relacionada às peculiaridades de cada célula e algum fator específico faz com que a HDFn resista muito melhor aos compostos.

Coelho (2015) estudou o efeito citotóxico de quinze bases de Schiff complexadas e seus ligantes livres frente a macrófagos, fibroblastos e *L. chagasi* e das 15 testadas 11 demonstraram efeito inibitório sobre o parasita. Os complexos de cobre foram os mais efetivos para *Leishmania* porem apresentaram citotoxicidade em macrófagos e fibroblastos. O resultado mais expressivo foi de Methoxy complexado com ferro o parasita e baixa citotoxicidade contra macrófagos. Nossa base de Schiff complexada com cobre não demonstrou efeito significativo em concentrações mais baixas e a citotoxicidade em fibroblastos dos dois complexos é consideravelmente alta. Através do estudo de Coelho podemos observar que o complexo de ferro demonstrou menos citotoxicidade, ou seja, podemos considerar como uma alternativa para estudos futuros a complexação com outros oligometais com o

intuito de melhorar sua eficácia sobre o parasita e diminuir sua citotoxicidade (COELHO, 2015).

A pesquisa pela literatura mostrou uma quantidade ainda muito pequena de estudos envolvendo bases de Schiff e *Leishmania*, porém nas publicações encontradas os autores obtiveram resultados melhores em relação a concentração e IC₅₀ das bases sobre o parasita geralmente com valores menores que 100 µg.mL⁻¹ como podemos observar no estudo de Salas e colaboradores (2017). Eles testaram a atividade de 1,2,4-triazolo [1,5-a] pirimidinas e seus complexos metálicos contra *Leishmania* spp. e relataram atividade moderada dos complexos em concentrações muito menores que as utilizadas em nosso estudo (SALAS et al, 2017). O complexo de cobalto em nosso estudo demonstrou melhores resultados sobre o parasita, porém ainda há a necessidade de reduzir nossas concentrações e para isto há a possibilidade de testar o salofen complexado com outros metais para posterior avaliação leishmanicida ou reduzir a quantidade do metal durante a síntese.

Neste trabalho, foi avaliado também a produção de EROs após exposição de 72 horas ao ligante livre Salofen e ao complexo de cobalto através da técnica utilizando o DCFH-DA. Segundo Esposti (2002), este reagente, atravessa a membrana celular e é desacetilado por enzimas mitocondriais e com isso ocorre a formação de 2,7-diclorodidrofluoresceína, responsável por emitir fluorescência e é esta fluorescência que é detectada pelo espectrofluorimétrico (ESPOSTI, 2002).

As concentrações testadas foram de 1000, 250 e 62,5 µg.mL⁻¹ para os dois materiais e os resultados foram comparados aos do controle negativo. Pudemos observar que o tanto para o complexo de cobalto quanto para o ligante livre, as células produziram uma quantidade considerável de EROs, porém, na concentração de 62,5 do Salofen, observamos os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio mais próximas ao controle negativo, ou seja, esta concentração não estimula a produção de uma quantidade elevada de EROs.

Sabemos que, a geração de radicais livres ocorre, comumente nas membranas celulares e citoplasma, porém, a principal fonte geradora é a mitocôndria (KOURY; DONANGELO, 2003).

Um estudo de Uddin e colaboradores (2019) apresentou resultados sobre a produção de EROs envolvendo outro grupo de bases de Schiff e células HeLa. Eles observaram membranas celulares desintegradas e proteína celular condensada, que segundo eles, pode ser devido à oxidação dos lipídeos e proteínas. Em nosso estudo, nas menores concentrações, apesar de haver produção de EROs, ao analisar a morfologia das células no microscópio notamos que a integridade da membrana celular apresentava aspecto normal, ou seja, não havia rompimento aparente da estrutura (UDDIN, et al 2019).

Santos (2015), estudou a conjugação de bases de Schiff e núcleos esteroidais como um antioxidante. Eles demonstraram que a porção esteroideal potencializou a ação antioxidante dos materiais, apesar de mostrarem que a imina das bases de Schiff testadas é ativa como antioxidante. Os grupos funcionais substituintes da porção aromática imínica terminal é que são responsáveis pela captação de radicais livres (SANTOS, 2015; ROSA et al, 2008).

Ainda sobre o estudo de Santos (2015), destacou-se que a molécula presente no grupo funcional da porção aromática é um grupo carboxila, então supõe-se que ela seja a responsável pela captação dos radicais livres. Os compostos menos ativos como antioxidantes, possuem um grupo nitro na posição para do anel aromático terminal, então, possivelmente, a presença deste grupo influencia negativamente na captação de radicais livres (SANTOS, 2015).

Ao avaliar por esta perspectiva, analisando os resultados do estudo citado acima e o nosso, há a hipótese de que a posição das moléculas na estrutura química influenciam tanto na geração de EROs, quanto na captação dos mesmos.

Um outro ponto a ser citado sobre estes materiais, tem relação com a solubilidade do ligante e dos complexos principalmente para os testes em meios muito aquosos. Nos testes com bactérias o meio de cultura utilizado é o Mueller-Hinton que possui uma consistência mais densa mesmo sendo diluído em água. Para estes testes nos utilizamos DMSO para ajudar na solubilização em meio de cultura e os complexos obtiveram uma melhor solubilidade. Para os experimentos de atividade leishmanicida e citotoxicidade em células, os meios de cultura utilizados são o 199, alfa men e RPMI com auxílio de tween 80 para

ajudar na suspensão do composto. Estes meios tem a característica bem aquosa e para estes testes encontramos uma maior dificuldade na solubilização total dos complexos. Isto nos leva a crer que se a solubilidade dos complexos fosse total, provavelmente nossas concentrações diminuiriam consideravelmente.

Segundo Duan, et al (2017), as propriedades hidrofóbicas e/ou lipofílicas desempenham um papel importante em relação a farmacocinética de um medicamento e a interação com alvos macromoleculares. Eles demonstraram através de testes de seus compostos sintéticos de coeficiente de partição lipídica, que valores moderados de entupimento P exibiram melhores atividades antimicrobianas, ou seja, compostos com lipofilidade adequada podem permear através da membrana celular e atingir os locais de ligação (DURAN et al, 2017). Estes dados corroboram com nossa hipótese de que se melhorarmos a solubilidade dos compostos através de modificações químicas da estrutura das moléculas melhoráramos ainda mais nossos resultados.

Um outro ponto de nosso estudo que obtivemos resultados promissores, foi na migração celular. As pesquisas de migração celular usando superfícies planas, proporcionou grandes avanços na descoberta de como as células translocam e regulam a direcionalidade em sua migração (YAMADA; SIXT 2019). Ao longo do ciclo de vida do organismo, a migração celular desempenha um papel fundamental no direcionamento dos processos biológicos, desde a migração coletiva até a vigilância das células imunológicas (FRIEDL; GILMOUR 2009; RIDLEY et al, 2003).

Um estudo de Trapella e colaboradores (2018), verificou a exposição de um composto chamado Helixcomplex sobre fibroblastos humanos e murinos e os efeitos dele na indução da proliferação destas células através dos ensaios de migração celular. Eles obtiveram resultados significativos no reparo do risco no poço através do crescimento celular. Identificaram que durante o tratamento, foi induzido uma quantidade significativa de IL-8 pelas células e acredita-se que ela teve um papel importante nos efeitos observados, além de outros fatores solúveis não identificados (TRAPELLA et al, 2018).

Tanto os resultados do estudo citado, como nossos resultados demonstram que a técnica utilizada tem grande importância para compreendermos como os compostos testados possivelmente agiram sobre

algum tipo de ferida na pele humana através da migração de celular da epiderme e da derme. Obtivemos resultados promissores com o complexo de cobalto e principalmente com o ligante livre. Demonstramos que em 48 horas houve crescimento total das células testadas nas duas menores concentrações.

Os resultados expostos permitem observar uma nova perspectiva para o uso da base de Schiff salofen e seus complexos metálicos, visando seu potencial antimicrobiano, avaliando suas propriedades da estrutura física e a citotoxicidade celular.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho após a avaliação o ligante livre da base de Schiff N,N'-bis(salicilideno)-1,2-fenilenodiamina e seus complexos metálicos com cobre (II) e cobalto (II) podemos concluir:

- Existem diferenças entre as estruturas físicas do Salofen e seus complexos metálicos, porém o complexo de cobalto se mostrou mais semelhante ao ligante livre. Isto pode ser um indício para posteriormente justificarmos as diferenças na atividade biológica destes materiais.
- Demonstramos a resistência do complexo de cobalto após passar por processo de autoclavagem através da análise dos picos Ramam que são idênticos antes e após esterilização.
- Em relação a atividade biológica, foi detectado nos estudos da fase 2 uma CIM de 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para *S. aureus* e uma CBM de 2000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para o complexo de cobalto. Ao analisar a curva de sobrevivência (*Time Kill*), foi possível observar que 250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ é a concentração bacteriostática e sua ação bactericida ocorre aproximadamente em 15 horas.
- Foi testado através das técnicas de MIC, CBM e *time kill*, o ligante livre sobre bactérias testadas na fase 2. Obteve-se uma CIM de 125 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*, *Salmonella*, *S. aureus* e de 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para *Pseudomonas*. Os resultados mais expressivos de CBM foram para *M. luteus* e *S. aureus* com uma concentração de 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. O resultado de *time kill* com *S. aureus* frente ao salofen foi bastante expressivo e demonstrou-se que a morte total das células bacterianas foi em 8 horas na concentração de CBM.
- Nos testes realizados no LaMiB, foi possível detectar a CIM porcentagem de inibição e a CBM para diversas cepas bacterianas. Percebeu-se que os complexos possuem maior atividade para as Gram-positivas, desta forma as inibições foram significativas até nas menores concentrações testadas sendo, entre 65%-95% para os *Staphylococcus*, em torno de 90% para *E. faecalis*, 86-95% para *M. luteus* e entre 85-95% para *B. subtilis*.
- Foram feitos testes de *time kill* com as cepas testadas na fase 1 com o complexo de cobalto frente a *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E.*

faecalis e o tempo de morte total dos microrganismos foram de 12, 16 e 16 horas respectivamente.

- Em relação aos testes de modulação obtivemos um resultado sinérgico entre o salofen e os antibióticos testados. A CIM dos antibióticos foi reduzida em 4 e 16X após a associação.
- Ao avaliar a atividade leishmanicida dos complexos metálicos, eles demonstraram efeito sobre o parasita, porém apenas nas concentrações mais altas. O complexo de cobalto demonstrou efeito parecido em 24 e 48 horas e o complexo de cobre demonstrou maior atividade em 48 horas.
- A citotoxicidade também foi avaliada em fibroblastos (HFF-1) em 24, 48 e 72 horas e o ligante livre demonstrou efeito menos tóxico principalmente nas menores concentrações quando comparado aos complexos metálicos.
- Foi testado também a citotoxicidade dos materiais em fibroblastos (HDFn) e queratinócitos (HaCat) e a viabilidade celular foi alta nas menores concentrações.
- Houve uma produção de EROs significativa quando comparada ao controle negativo, porém na concentração de $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pudemos observar uma produção menor, quase a mesma quantidade produzida pelo controle negativo.
- Com relação a migração celular, foram feitos estudos do complexo de cobalto e do ligante livre sobre queratinócitos (HaCat) e obtivemos bons resultados principalmente com o ligante livre, onde houve crescimento celular total em 48 horas. Este tempo foi o mesmo do controle de crescimento onde não havia tratamento algum, então podemos concluir que nas duas menores concentrações testadas o tratamento não interferiu ou atrapalhou o crescimento celular.
- O teste de migração celular em fibroblastos (HDFn) foi realizado apenas com o ligante livre e podemos concluir que este material nas duas menores concentrações não impede o crescimento desta

linhagem de fibroblasto pois, o fechamento total do risco foi em 48 horas, igual ao controle de crescimento.

Sendo assim, os dados sugerem que o ligante livre e o complexo de cobalto apresenta atividade antimicrobiana mais expressiva comparado ao complexo de cobre. Os materiais apresentaram atividade leishmanicida, porém as doses eficientes foram relativamente altas. Quanto à citotoxicidade em células de pele (duas linhagens de fibroblastos e queratinócito), demonstramos que nas menores concentrações a viabilidade celular se manteve em níveis elevados. Desta forma é possível vislumbrar um potencial uso farmacológico promissor para estes compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.ALLEN, H. K., et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, p.251-259, 2010.

ABDEL-RAHMAN, L. H. et al. Sonochemical Synthesis, DNA Binding, Antimicrobial Evaluation and in Vitro Anticancer Activity of Three New Nano-Sized Cu(II), Co(II) and Ni(II) Chelates Based on Tri-Dentate NOO Imine Ligands as Precursors for Metal Oxides. **Photochem Photobiol B**. v.162, p.298-308, 2016.

ABU-DIEF, A. M., MOHAMED, M. A. A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. **Journal of Basic and Applied Sciences**. v.4, p. 119-133, 2015.

AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**. v.57, p.1-29, 2017.

AKINSOLU, F. T., et al. Emerging resistance of neglected tropical diseases: A scoping review of the literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v.16, 2019.

ALENCAR, L. C. B. et al. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero Spondias sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.36, p.111-116, 2015.

ALGHAMDI, F., SHAKIR, M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a
ALVES, H. C. et al. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. In: Amidou Samie (Org.). Antibiotic Resistance among *Escherichia coli*: Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. **Croatia: InTech Open Scienc**. v. 1, p. 99-122, 2017.

AMIT, M. et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. **Biology of reproduction**. v.68, p.2150-2156, 2003.

APPELT, P. **Síntese, caracterização e atividade biológica de complexos de rutenio (II) contendo ligantes tiazolinas**. 236f. Tese de

Doutorado – Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná – 2017.

ARAÚJO, M. B.; MELLO, M. A. R. Exercício, estresse oxidativo e suplementação com creatina. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. v.3, p. 264-272, 2009.

BAJEMA, E. A., ROBERTS, K. F., MEADE, T. J. Cobalt-Schiff Base complexes: Preclinical research and potential therapeutics uses. **Metal Ions in Life Sciences**. v.19, p.267-301, 2019.

BARON, S. Medical microbiology. 4th. **University of Texas**, Texas, 1996

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table:

BECHER, E. M.; NISSE, L. R. SKIBSTED, L. H. . Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **Eur. Food Res. Technol.** v. 219, p. 561-571, 2004.

BENGTSSON-PALME, J., KRISTIANSSON E., LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Review**. v.42. p.41, 2017.

BERTRAND, B.; CASINI, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. **Dalton Transactions**. v.43, p. 4209-4219, 2014.

BHAT, K. et al. Synthesis and characterization of various Schiff bases for nonlinear optical applications. **Materials Chemistry and Physics**. v.44, p.261-266, 1996.

Biggest Threats and Data. 2019. Disponível em:< <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>>. Acesso em 08 Maio. 2020.

BIRDEN, E., et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**. v.5, p. 9-19, 2012.

BURZA, S. CROFT, S. L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**. v.392, p.951-970, 2018.

CAMPOS, A. C. F. B. et al. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, p. 575-580, 2013.

CERCEO, E. et al. Multidrug-Resistant Gram-Negative bacterial infections in the hospital setting: Overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. **Microbiology Drug Resistance**. v.22, p.412-431, 2016.

CHANG, E. L., SIMMERS, C., KNIGHT, D. A. Cobalt complexes as antiviral and antibacterial agents. **Pharmaceuticals**. v.3, p.1711-1728, 2010. **Chichester: John Wiley & Sons**. p.217, 2013.

CHOHAN, Z. H. et al. Some new biologically active metal-based sulfonamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.45, p.2893-2901, 2010.

CHOO-SMITH, L.-P et al. Investigating Microbial (Micro) colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. **Appl. Environm. Microbiol.** v.67, p.1461-1469, 2001.

CHUA, M. J. et al. Effect of Clinically Approved HDAC Inhibitors on *Plasmodium*, *Leishmania* and *Schistosoma* Parasite Growth. **International Journal for Parasitology**, n.7, p. 42-50, 2017.

CIRINO, I. C. S. **Modulação da resistencia a drogas por oleos essenciais em linhagens de *Staphylococcus aureus***. 79f. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciencias Exatas e da Natureza, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M7-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bactéria that grow aerobically**. 9.ed. Wayne, PA, 2012.

COELHO, L. G. G. **Bases de Schiff como potenciais agentes leishmanicidas contra *Leishmania chagasi in vitro***. 105f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em biotecnologia, 2015.

DAS, R. S.; AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57 p. 163-176, 2011.

DAYABARAN, V. V. et al. Novel Bioactive Co(II), Cu(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes with Schiff Base Ligand Derived from Histidine and 1,3-Indandione: Synthesis, Structural Elucidation, Biological Investigation and Docking Analysis. **Journal of Fluorescence**. v.27, p.135-150, 2016.

Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. **Cereus**. v.12, e7257, 2020.

DUARTE, M. C. et al. An Effective in vitro and in vivo Antileishmanial Activity and Mechanism of Action of 8-hydroxyquinoline Against *Leishmania* Species Causing Visceral and Tegumentary Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.217, p.81-88, 2016.

DUBREUIL, J. D. Fruit extracts to control pathogenic *Escherichia coli*: A sweet solution. **Heliyon**. v.6, e03410, 2020.

DURAN, J. R. Design, synthesis and biological evaluation of novel Schiff base-bridged tetrahydroprotoberberine triazoles as a new type of potential antimicrobial agents. **MedChemComm**. v. 8, p. 907-916, 2017.

DWYER, F. P., et al. Biological activity of complex ions. **Nature**. v.170, p.190-191, 1952.

enhancing agents. **Journal of the Chemical Society**. v. 17, p. 2885-2892, 2000.

ESPOSTI, M. D. Medindo espécies reativas de oxigênio mitocondrial. **Methods**. v.26, p.335-340, 2002.

FARIA, D. L. A. de; SANTOS, L. G. C.; GONCALVES, N. S.. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. **Quimica Nova**. v.20, p.319-323, 1997.

FEIJÓ, D. et al. Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, 2016.

FEIJÓ, D. et al. Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, 2016

FERREIRA, L. L., et al. Cuidado de enfermagem nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde: Scoping review. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v.72, p.476-483, 2019.

FINLEY, R. L., et al. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases**. v.57, p.704-710, 2013.
fluorescens. **Microb. Ecol.** v.53, p. 414-425, 2007.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.10, p. 445-457, 2009.

FRÖHNER, C. R. A. Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade da Violaceína, produzida pela *Chromobacterium*

violaceum. 136f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2003.

GARZA-CERVANTES, J. A. et al. Re-sensitizing ampicillin and kanamycin-resistant *E. coli* and *S. aureus* using synergistic metal micronutrients-antibiotic combinations. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020.

GASSER, G.; METZLER-NOLTE, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.16, p. 84-91, 2012.

GAVELÁN, R. N. B. **Estudo das propriedades estruturais, elétricas e ópticas de filmes finos de niobato de sódio e potássio (KNN), fabricados por deposição a laser pulsado (PLD)**. 90f. Tese de Doutorado – Programa de pós Graduação em física – UFSCar, 2017.

GHORBANI, M., FARHOUDI, R. Leishmaniasis in human: Drug or vaccine therapy. **Drug Design, Development and Therapy**. v.12, p.25-40, 2018.

GIADA, M. D.; MANCINI, J. F. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **Int. J. Food Sci. Nutr**. v. 60, p. 395-401, 2009.

GOUVEIA, S. S.; LIMA, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v.20, p. 174-179, 2017.

GROENEVELD, M. C.; EVERTS, V.; BEERTSEN, W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained *in vitro*. **Journal Dent Research**. v. 73, p. 1588-1592, 1994.

HAACK, M. S. **Identificação e caracterização de materiais por espectroscopia Ramam**. 33f, trabalho de conclusão de curso, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

HALLWELL, B., et al. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work?. **Crit. Rev. Food Sc. Nutr**. v. 35, p. 7-20, 1995.

HAMEED, A. et al. Schiff bases in medicinal chemistry: a patent review (2010-2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v.27, p.63-79, 2016.

HAQUE, M. et al. Health care-associated infections an overview. **Infection and Drug Resistance**, v.11, p.2321-2333, 2018.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97, p.1027-1031, 2002.

HU, Y. A New approach for the Discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections. **PLoS ONE**. v.5, 2010

HUANG, D. et al. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p. 1815-1821, 2002.

HUANG, W. E. et al. Single-Cell Raman Spectral Profiles of *Pseudomonas*

HUGHES, D.; ANDERSSON, D.I. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. **Annual Review of Microbiology**. v.71, p.579-596, 2017.

HUIJBERS, P. M. C., et al. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: A review. **Environment Science & Technology**. v.49, p.11993-20040, 2015.

JACOB, V. P. **Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 β -estradiol**. 73f. Dissertação de Mestrado – Universidade da Beira Interior (Ciências da Saúde) – 2011.

JARVIS, R. M.; GOODACRE, R.. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**. v. 76, p.40-47, 2004.

JUNIOR, M. A. A. L. **Síntese e estudo in sílico de biaril-bases de Schiff**. 119f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, 2018.

JUTKINA, J., et al. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. **Science of the Total Environment**. v.131, p.548-549, 2016.

KALLMEYER, J. et al. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.109, p.16213-16216, 2012.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**. v.16, p.433-441, 2003.

LAWYER, P. G. et al. Developmental of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). **Journal Medical Entomology**. v.24, p.347-355, 1987.

LEE, J. Y. H. et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. **Nature Microbiology**. v.3. p. 1175-1185, 2018.

LEMOS, R. C. **Testes de citotoxicidade in vitro no controle da qualidade de biomateriais empregados em luvas utilizadas por profissionais da FIOCRUZ**. 119f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz – 2018.

LERMINIAUX, N. A., CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**. v.65, p.34-44, 2019.

LEVIN, B. R.; BAQUERO, F.; JOHNSEN, P. J. A model-guided analysis and perspective on the evolution and epidemiology of antibiotic resistance and its future. **Current Opinion in Microbiology**. v.19, p.83-90, 2014.

LIANG, C. C. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Publishing Group**. v. 2, p.329-333, 2007.

LIU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radicals Response**. v.44, p. 109, 2010.

LIU, J. Y.; DICKTER, J. K. Nosocomial Infections. A history of hospital-acquired infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**. v.30, p.637-352, 2020.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**. v. 20, p. 520-532, 1998.

MACKAY, M.L.; MILNE, K.; GOULD, I. M. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 15, p.125-129. 2000.

MALAPASS, A. C. et al. Comparison of growth methods and biological activities of Brazilian Streptomyces. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 125-131, 2013.

MANTRAVADI, P. K., et al, The Quest for Novel Antimicrobial Compounds: Emerging trends in research, development, and technologies **Antibiotics**. v.8, 2019.

MARAGON, C. A. **Formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo**: nova alternativa para o controle de *Staphylococcus* spp. 117f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.

MARAN, N. et al. Host Resistance to Visceral Leishmaniasis: Prevalence and Prevention. **Expert Review of Anti-Infective**, n.4, v.14, p. 435-442, 2016.

MARAN, N. et al. Host Resistance to Visceral Leishmaniasis: Prevalence and Prevention. **Expert Review of Anti-Infective**, n.4, v.14, p. 435-442, 2016.

MARKOWSKA, A. et al. Noble metals in oncology. **Contemporary Oncology**. v. 19, p. 271-5, 2015.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, 2012.

MARQUES, L. H. S. et al. *Leishmania infantum*: Illness, Transmission Profile and Risk Factors for Asymptomatic Infection in an Endemic Metropolis in Brazil. **Parasitology**, p. 1-11, 2016.

MARTINEZ, J. L. Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v.2, p.265, 2011.

MARTINEZ, J. L., COQUE, T. M., BAQUERO, F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. **Nature Reviews microbiology**. v.13, p.116-123, 2015.

MASSON, A. O., LOMBELLO, C. B. Metodologias de avaliação citotóxica: Estudo comparativo segundo tempo de exposição. **COLAOB**. 2016.

MATSUMOTO, M. Y. **Síntese, caracterização, atividade antineoplásica e catalítica de complexos de níquel (II) derivados de bases de Schiff**. 89f. Dissertação de mestrado – Ciência e tecnologia Ambiental – 2013.

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 284, p. 329-350, 2015.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The Estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal Hygiene**, v.38, p.732-749, 1938.

MONTEIRO, J. C. M. **Oligoelementos na nutrição humana**. 65f. Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas moniz – 2017.

MORE, M. S. et al. Metal complexes driven from Schiff bases and semicarbazones for biomedical and allied applications: a review. **Materials Today Chemistry**. v.14, 2019.

MORRIS, S., CERCEO, E. Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant Gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. **Antibiotics**. v.9, p.196, 2020.

MUNTEANU C. R., SUNTHARALINGAM, K. Advances in cobalt complexes as anticancer agents. **Dalton transactions**. v.44, p.13796-13808, 2015.

MUNTEANU, C. R., SUNTHARALINGAM, K. Advances in cobalto complexes as anticâncer agentes. **Dalton Transactions**. v.44, p.13796-13808, 2015.

MWANGI, J. Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. **Zoological Research**. v.40, p.488-505, 2019.

NETA, M. C. S. et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24h time–kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**. v.55, p.190-197, 2016.

NISHIMURA, S.; MATSUYAMA, S.; YAMAMOTO, K. *Staphylococcus saprophyticus* native valve endocarditis possibly originating from the lower gastrointestinal tract. **IDCases**. v.19, e00713, 2020.

NOGUEIRA, L. G. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. E de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori***. 107f. Tese de Doutorado – Faculdade de ciências farmacêuticas – UNESP, 2012.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistanct infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**. f.80. 2016.

OLIVEIRA, F. S. S. **Caracterização bioquímica de espécies bacterianas patogênicas através da espectroscopia Ramam e análise discriminante**. 89f. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Strictu Sensu em Engenharia Biomédica – Universidade Anhembi Morumbi, 2018.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, n.6, 2018. Disponível em < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34857> >. Acesso em 21 julho 2020.

PALIOTO, D. B. Comparação entre fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal de um mesmo indivíduo. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v.16, p. 319-325, 2002.

PEREIRA, D. K. S. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de complexos metálicos sintetizados com ligantes orgânicos**. 157f. Dissertação de mestrado (Ciencias Aplicadas a Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Jataí – 2015.

PÉRES, J.J., J.; SAURA, F. C. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res. Int.** v. 39, p. 791-800, 2006.

PIMENTA, P. F. P., FREITAS, V. C., SECUNDINO, N. F. C. **A interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores**. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM. Capítulo 12, 2012.

PORSE, A. et al. Genome dynamics of Escherichia coli during antibiotic treatment: Transfer, loss, and persistence of genetic elements in situ of the infant gut. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.7, p.126, 2017.

PRUDEN, A., et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. **Environ Health Perspect.** v.121, p;878-850, 2013.

PUCHKOVA, L. V. et al. Copper metabolism of newborns is adapted to milk ceruloplasmin as a nutritive source of copper: overview of the current data. **Nutrients**. v.10, 2018.

RATNER, B. D. et al. Biomaterials science a multidisciplinary endeavor, in biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **Elsevier Science**, 2004.

RIDLEY, A. J.; et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**. v.302, p. 1704-1709, 2003.

ROCHA, D. P., et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**. v.34, p.111-118, 2011.

RÖHRIG, C. et al. Targeting Hidden Pathogens: Cell Penetrating Enzybiotics Eradicate Intracellular Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **mBio American Society for Microbiology**. v.11, p. 1-19, 2020.

ROSA, C. S. D., et al. Atividade antioxidante de ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**. v.38, p. 2593-2698, 2008.

ROSER, M.; RITCHIE, H.; DADONAITE, B. Child and Infant Mortality, 2019. Our World in Data. Disponível em < <https://ourworldindata.org/child-mortality>>. Acesso em 16 junho 2020.

SALAS, J. M. et al. Leishmanicidal and Trypanocidal Activity of Metal Complexes with 1,2,4-Triazolo[1,5-a]pyrimidines: Insights on their Therapeutic Potential against Leishmaniasis and Chagas Disease. **Current Medicinal Chemistry**. v.24, p.2796-2806, 2017.

SANTAJIT, S., INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomedical Research International**. 8p. 2016.

SANTOS, A. L. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, p.413-423, 2007.

SANTOS, J. A. **Preparação e avaliação biológica de conjugados esteróides/ bases de Schiff**. 278f. Tese de doutorado. Area de contenção: Química orgânica. Universidade Federal de Juíz de Fora, 2015.

SANTOS, S. F. F. **Determinação da estrutura cristalográfica e estudo teórico de compostos de base de Schiff**. 116f. Tese de Doutorado – Instituto de Química de São Carlos - USP, 2017.

SCHIFF, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. **Justus Liebigs Ann. Chem**. v.131, p.118-119, 1864.

SEETHALER, M. et al. Novel small-molecule antibacterials against Gram-positive pathogens of *Staphylococcus* and *Enterococcus* species. **Antibiotics**. v.8, p.210, 2019.

SENA, C. M. S. **Estudo do perfil microbiológico da seção de envasamento e acondicionamento de soros e vacinas desenvolvidos no Instituto Butantan**. 68f. Monografia – Programa de Aprimoramento Profissional – SES-SP no Instituto Butantan, 2014.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. **Cell**. v.164, p.337-340. 2016.

SERAFIM, M. L. R. C. **Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras provenientes do aterro controlado da cidade de Campos dos Goytacazes – RJ**. 154f. Dissertação de mestrado – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2013.

SIES, H. Oxidative Stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. v.4, p.180-183, 2015.

SIFAQUI, I. et al. Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of *Leishmania* species and their correlation with the antioxidant activity. **Experimental Parasitology**, v.141, p. 106-111, 2014.

SMEE, D. F. et al. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**. v.106, p.71-79, 2002.

SMILLIE, C. S., et al. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. **Nature**. v.480, p.241-244, 2011.

SMITH, E.; DENT, G. Modern Raman spectroscopy: a practical approach.

SOARES, A. S. **A ação da lectina nativa de *Bauhinia variegata* na regeneração tecidual**. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Pelotas – 2017.

SOLOMON, E. I. Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry: blue to green to red copper sites. **Inorganic Chemistry**. v.45, p.8012-8025, 2006.

SOUZA, R. D. **Esporos de *Bacillus subtilis* como adjuvante vacinal**. 118f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2014.

TAGLIABUE, A.; RAPPUOLI, R. Changing Priorities in vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. **Frontiers in Immunology**. v.9, 2018.

TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: More questions than answers. **Nutrition Research**. v. 20, p. 449-459, 2000.

THOMPSON, K. ORVIG, C. Design of vanadium compounds as insulin
TIMBRELL J. A. **Principles of biochemistry toxicology**. 4^aed. Nova York. Editora Informa Heathcare. p.12-14, 2009.

TOLEDO, T. A. **Aplicações da espectroscopia Raman ao estudo dos efeitos de temperatura e de pressão hidrostática em cristais orgânicos: 2-amino-1,3,4-tiadiazol, 2-amino-5-fenil-1,3,4-tiadiazol e 2-amino-5-(4-deciloxi-fenil)-1,3,4-tiadiazol**. 248f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Física) – Universidade Federal de São Carlos, 2015.

TOLEDO, T. A. et al. Spectroscopy Studies on Schiff Base N,N'-bis(Salicylidene)-1,2-phenylenediamine by NMR, Infrared, Ramam and DFT Calculations. **Journal of Molecular Structure**, 2015.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12^a edição. Artmed Editora, 2016.

towards new targets. **Chemical Communications**. v.49, p. 5106-5131, 2013.

UDDIN, N. et al. Synthesis, characterization, and anticancer activity of Schiff bases. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. 2019.

URABE, H.; TOMINAGA, Y.; KUBOTA, K. A evidência experimental de vibrações coletivas no DNA dupla hélice espectroscopia Ramam. **Journal of Chemical Physics**. v. 78, p. 5937-5939, 1983.

UZCANGA, G. et al. Nuclear DNA Replication and Repair in Parasites of Thegenus *Leishmania*: Exploiting Diferences to Develop Innovative the Therapeutic Approaches. **Critical Reviews in Microbiology**, n.2, v.43, p. 156-177, 2017.

VALLEJO, M. J.; SALAZAR, L.; GRIJALVA, M. Oxidative stress modulation and ROS-mediated toxicity in câncer: A review on in vitro models for plant-derived compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2017.

VANGRIENSVEN, J. et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. v.20, p.286-299, 2014.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Crisis. **Pharmacology & Therapeutics**. v.40, p.277-283, 2015.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**. v.14, p.99-103, 2016.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**. v.33, p.406-414, 2009.

VIEIRA, MARCELO S. **Emprego da citotoxicidade basal in vitro na redução do número de animais em ensaios de avaliação da toxicidade oral aguda: a grandisina e seu metabólito majoritário como protótipos**. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – 2009.

WANG, M. et al. Cladodionen Is a Potential Quorum Sensing Inhibitor Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Marine Drugs**. v.18, 205, 2020.

WANG, W. et al. Epidemiological study on prevalence, 1 serovar diversity, multi-drug resistance and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella* spp. From patients with diarrhea, food of animal origin, and pets in several provinces of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020.

WIEDENBECK, J., COHAN, F. M. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. **FEMS Microbiol Review**. v.35, p.957-976, 2011.

WILHELM, T. J. Viszerale Leishmaniose. **Der Chirurg**. 2019.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability. **Animal Cell Culture**. 3ed. Oxford University. p.175-219, 2000.

XU, Y., et al. Free radical derivatives formed from cyclooxygenase-catalyzed dihomo- γ -linolenic acid peroxidation can attenuate colon cancer cell growth and enhance 5-fluorouracil's cytotoxicity. **Redox Biology**. v.2, p.610-618, 2014.

YAMADA, K. M.; SIXT, M. Mechanisms of 3D cell migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 20, p. 738-752, 2019.

YANG, B., CHEN, Y., SHI, J., Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. **Chemical Reviews**, 2019.

YAP, P. S. X. et al. Whole genome analysis of multidrug resistant *Citrobacter freundii* B9-C2 isolated from preterm neonate's stool in the first week. **Journal Pre-proof**. v.20, 2020.

ZHANG, Y. et al. Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across genera. **Environmental Science & Technology**. v.51, p.570-580, 2017.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kalaazar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasit Vectors*. v.9, p.464, 2016.

ZORODDU, M. A. et al. The essential metals for humans: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.195, p.120-129, 2019.