

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

BIANCA SORIANO

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E LEISHMANICIDA DE
MATERIAIS ORGÂNICOS DERIVADOS DA
BASE DE SCHIFF N,N-BIS'(SALICILIDENO)-
1,2-FENILENODIAMINA***

São Carlos
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BIANCA SORIANO

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E LEISHMANICIDA DE
MATERIAIS ORGÂNICOS DERIVADOS DA
BASE DE SCHIFF N,N-BIS'(SALICILIDENO)-
1,2-FENILENODIAMINA***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia: Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bianca Soriano, realizada em 05/05/2017:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Profa. Dra. Andrea Cristina Bogas
ESALQ-USP

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia
USP

Resumo

As bactérias e fungos são os principais agentes etiológicos potencialmente ocasionadores de infecções relacionadas ao cuidado em saúde e a quarta causa de morte, segundo a OMS. Agentes parasitários como a *Leishmania infantum chagasi*, ocasionador da leishmaniose, doença negligenciada e endêmica, possuem tratamentos nem sempre efetivos e com graves efeitos colaterais. A resistência aos antibióticos, antimicóticos e leishmanicidas, tem induzido cada vez mais, a bioprospecção e síntese de novas substâncias com propriedades farmacológicas. A base de Schiff, em especial os derivados do ligante N,N'-bis(salilcilideno)-1,2-fenilenodiamina, também conhecido por Salofen, vem sendo estudada, com o intuito de se evidenciar as propriedades físicas, químicas e biológicas devido à variedade de potenciais aplicações tecnológicas. O objetivo deste trabalho foi, avaliar o potencial biotecnológico do derivado da base de Schiff N,N'-bis(salilcilideno)-1,2-fenilenodiamina (Salofen) em relação à atividade antimicrobiana e leishmanicida. Foram utilizadas as técnicas de difusão em ágar e ensaios de microdiluição para os estudos com bactérias e levedura, e o método colorimétrico com Alamar Blue®, para os testes com *Leishmania* em 24 e 48 horas. Observou-se halos de inibição para todos os microrganismos testados, sendo a maior média de halos (30 mm) para *Candida albicans*. Os ensaios de diluição demonstraram resultados promissores, com taxas de inibição superiores a 90%, ressaltando uma melhor eficiência com as Gram-negativas. Observou-se também, o efeito leishmanicida, com IC₅₀ em 1.06 mg.mL⁻¹ em 24 horas e 0.66 mg.mL⁻¹ em 48 horas. Assim, os dados coletados, sugerem que a base de Schiff testada possui um potencial antimicrobiano e leishmanicida do composto estudado sugerindo uma aplicação biotecnológica.

Palavras-Chave: Microrganismos, *Leishmania*, Salofen, ensaios de microdiluição.

Abstract

Bacteria and fungi are the main etiological agents potentially causing health care-related infections and the fourth leading cause of death, according to the WHO. Parasitic agents such as *Leishmania infantum chagasi*, the causative agent of leishmaniasis, neglected and endemic disease, have treatments that are not always effective and have serious side effects. Resistance to antibiotics, antimycotics and leishmanicides, has increasingly induced bioprospecting and synthesis of new substances with pharmacological properties. The Schiff bases, especially those derived from the N, N'-bis (salylcilidene) -1,2-phenylenediamine linker, also known as Salofen, have been studied in order to demonstrate the physical, chemical and biological properties due to Variety of potential technological applications. The objective of this work was to evaluate the biotechnological potential of the Schiff N, N'-bis (salylcilidene) -1,2-phenylenediamine (Salofen) base derivative in relation to the antimicrobial and leishmanicidal activity. Agar diffusion techniques and microdilution assays were used for bacterial and yeast studies, and the colorimetric method with Alamar Blue® for *Leishmania* tests at 24 and 48 hours. Inhibition halos were observed for all microorganisms tested, with the highest mean halos (30 mm) for *Candida albicans*. Dilution assays have shown promising results, with inhibition rates above 90%, emphasizing better Gram-negative efficiency. The leishmanicidal effect was also observed with IC₅₀ at 1.06 mg.mL⁻¹ at 24 hours and 0.66 mg.mL⁻¹ at 48 hours. Thus, the data collected suggest that the Schiff base tested has an antimicrobial and leishmanicidal potential of the compound studied, suggesting a biotechnological application.

Key-words: Microorganisms, *Leishmania*, Salofen, microdilution assays.

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BHI	Infusão Cérebro-Coração.
CIM	Concentração Inibitória Mínima.
EDX/EDS	Energy-dispersive X-ray spectroscopy.
DMP	Departamento de Morfologia e Patologia.
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
DTA	Análise Térmica Diferencial.
DSC	Calorímetro Diferencial de Varredura.
DTA	Análise Térmica Diferencial
FDA	Food and Drug Administration.
IC50	Índice de Citotoxicidade.
MH	Mueller Hinton.
NaCl	Solução salina.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PBS	Tampão Fosfato Salino.
RPM	Rotação Por Minuto.
SBF	Soro Bovino Fetal.
TSA	Tripsona Soja ágar.
UFC	Unidade formadora de Colônia
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos.

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema da reação química para a obtenção da base Schiff Salofen . . .	19
Figura 2 – Aspecto do Salofen durante a produção.	21
Figura 3 – Mapa da microplaca de 96 poços para o teste de microdiluição. Este esquema foi utilizado para todas as cepas testadas	23
Figura 4 – Células de <i>Leishmania infantum chagasi</i> em frasco T	24
Figura 5 – Formas promastigotas da <i>L. infantum chagasi</i> . (A) Configuração individual - objetiva 20x; (B) Configuração de rosetas - objetiva 40x. Visualização feita através de microscópio ótico.	25
Figura 6 – Mapa da placa utilizado no primeiro experimento com <i>Leishmania infantum chagasi</i>	26
Figura 7 – Mapa da placa utilizado no segundo experimento com <i>Leishmania infantum chagasi</i>	26
Figura 8 – Imagem fotográfica de alguns ensaios de difusão em ágar de concentrações de salofen	28
Figura 9 – Gráfico comparativo dos halos (mm) formados de acordo com as concentrações do salofen e os microrganismos testados	28
Figura 10 – Halos de inibição (mm) utilizando-se concentrações de 25 mg.mL ⁻¹ , 35 mg.mL ⁻¹ e 50 mg.mL ⁻¹ da base de Schiff Salofen e Gentamicina frente a A) <i>Salmonella</i> spp. B) <i>E. faecalis</i> . C) <i>B. subtilis</i> . D) <i>S. epidermidis</i> . (*) p < 0.05 entre os grupos comparados pelas setas.	29
Figura 11 – Gráfico de emissão de fluorescência para <i>Salmonella</i> spp	30
Figura 12 – Gráfico de emissão de fluorescência para <i>C. freundii</i>	31
Figura 13 – Gráfico de emissão de fluorescência para o microrganismo <i>S. aureus</i>	32
Figura 14 – Gráfico de emissão de fluorescência para o microrganismo <i>S. epidermidis</i>	33
Figura 15 – Gráfico de emissão de fluorescência para o microrganismo <i>B. subtilis</i>	34
Figura 16 – Gráfico da porcentagem de inibição de bactérias Gram negativas <i>C. Freundii</i> e <i>Salmonella</i> spp frente a concentrações da base de Schiff Salofen	35
Figura 17 – Gráfico da porcentagem de inibição de bactérias Gram positivas <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>S. epidermidis</i> frente a concentrações da base de Schiff Salofen	36
Figura 18 – Gráfico da absorvância obtida para <i>Leishmania infantum chagasi</i> em 24 horas nas concentrações de 1 mg.mL ⁻¹ a 15 mg.mL ⁻¹ . Os (*) representam diferenças significativas entre os grupos quando comparados com o controle e o Tween 80 (p < 0.05).	37

Figura 19 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra a forma promastigota de <i>L. infantum</i> , em 24 horas. Valor representativo dos experimentos realizados em triplicata.	38
Figura 20 – Gráfico da absorbância obtida para <i>Leishmania infantum chagasi</i> em 48 horas nas concentrações de 1 mg.mL ⁻¹ a 15 mg.mL ⁻¹	39
Figura 21 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra promastigota de <i>L. infantum</i> , ás 48 horas. Valor representativo dos experimentos, realizados em triplicata.	39
Figura 22 – Gráfico da absorbância obtida para <i>Leishmania infantum chagasi</i> em 24 horas nas concentrações de 1 mg.mL ⁻¹ a 3,5 mg.mL ⁻¹	40
Figura 23 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra a forma promastigota de <i>L. infantum</i> , em 24 horas. Valor representativo dos experimentos, realizados em triplicata.	41
Figura 24 – Gráfico da absorbância obtida para <i>Leishmania infantum chagasi</i> em 48 horas nas concentrações de 1 mg.mL ⁻¹ a 3,5 mg.mL ⁻¹	41
Figura 25 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra promastigota de <i>L. infantum</i> , em 48 horas. Valor representativo dos experimentos, realizados em triplicata.	42
Figura 26 – Imagem microscópica (40x) da base de Shiff Salofen agindo sobre células de <i>Leishmania</i> . A) Cristais em contato com formas viáveis do parasita. B) Cristais após a eliminação do parasita em 24 horas.	42

Lista de tabelas

Tabela 1 – Determinação das médias dos halos (mm) dos testes de difusão em ágar nas concentrações de 25 mg.mL ⁻¹ e 50 mg.mL ⁻¹ ; Desvio padrão (DP); (x) sem resultados.	27
--	----

Sumário

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Atividade antimicrobiana e antifúngica	12
2.2	Atividade leishmanicida	16
2.2.1	Leishmaniose visceral	17
2.3	Bases de Schiff	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo Geral	20
3.2	Objetivos Específicos	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Caracterização da molécula	21
4.2	Microrganismos	21
4.3	Determinação da atividade antimicrobiana	22
4.3.1	Difusão em ágar	22
4.3.2	Ensaio de microdiluição	22
4.4	Determinação da atividade leishmanicida	24
4.5	Análise Estatística	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Determinação da atividade antimicrobiana	27
5.1.1	Teste de difusão em ágar	27
5.1.2	Ensaio de microdiluição	29
5.2	Atividades in vitro da base de Schiff Salofen contra a forma promastigota de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	36
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES	46
8	Referências Bibliográficas	47

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as bactérias e os fungos são os principais causadoras de infecções relacionadas ao cuidado em saúde e constituem-se na quarta causa de morte de pacientes, perdendo apenas para doenças cardiovasculares, câncer e violência. A taxa de infecção hospitalar no Brasil é de 15%, e em países desenvolvidos como os Estados Unidos, o mesmo índice é de 10% (Instituto Oswaldo Cruz, 2010). Trabalho conduzido por Argaw et al., (2017) constatou que embora a maior parte dos pacientes tenham recebido antimicrobianos como medida profilática, a prática não estava alinhada com as recomendações padrão e os pacientes desenvolveram infecção do sítio cirúrgico. Estes dados corroboram com os elevados índices de infecção hospitalar apresentadas.

O surgimento de patógenos multirresistentes criou uma intensa crise econômica e de saúde global cada vez mais significativa (HUTTNER et al, 2013). Este fato é considerado pela OMS como uma das três principais ameaças à saúde pública no mundo (BASSETTI e GINOCCHIO, 2011).

Os microrganismos desenvolveram resistência a praticamente todas as classes de antibióticos de uso corrente (BHATT et al, 2013; RATTI et al, 2012; PIZA et al, 2015). A resistência a certos antibióticos, muitas vezes se desenvolve em, pelo menos, uma espécie bacteriana dentro de um ano, após a aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) (HU, Y. et al, 2010). A prevalência da multirresistência bacteriana supera amplamente o desenvolvimento de novas classes de antibióticos (BOUCHER et al, 2009; MALPASS et al, 2013; ROMANO et al, 2014).

A resistência aos antibióticos e antimicóticos é de preocupação mundial devido a inevitável consequência de seu mal uso, principalmente nos países em desenvolvimento (LUJÁN, et al, 2011; ROMANO et al, 2014).

Na busca por novos tratamentos para infecções causadas por bactérias e fungos, a descoberta de novos produtos de origem vegetal ou de síntese desperta muito interesse para novos estudos e pesquisas (SARAIVA et al, 2013).

Assim como as bactérias e fungos, as doenças parasitárias representam uma alta taxa de mortalidade e morbidade e infecta milhões de pessoas por todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Ao observar os casos registrados oficialmente, são diagnosticados por ano aproximadamente 58.000 casos de leishmaniose visceral como consequência da contaminação pelas espécies de *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi*, situação que se agrava devido a sua ampla distribuição geográfica, severas manifestações clínicas e carência de fármacos efetivos, criando uma necessidade de estu-

dos voltados para busca por novos compostos com ação leishmanicida (FEIJÓ et al, 2016; MARAN et al, 2016).

Assim, dentro deste panorama, nos últimos anos, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de compreender as propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais orgânicos devido à variedade de potenciais aplicações tecnológicas. Entre eles, destaca-se a classe de materiais denominados bases de Schiff, com atenção especial aos derivados do ligante N,N'-bis(salilcilideno)-1,2-fenilenodiamina, também conhecido por Salofen (fórmula química $C_{20}H_{16}N_2O_2$) (de TOLEDO et al, 2015).

Embora a literatura sobre estes materiais contemple uma vasta gama de informações relevantes, tais como a caracterização de suas propriedades estruturais, microestruturais, vibracionais, ópticas e térmicas, ainda existem aspectos a serem explorados e debatidos como suas propriedades biológicas (de TOLEDO et al, 2015).

No presente trabalho, foi estudado a atividade antimicrobiana *in vitro* do material derivado da base de Schiff N,N-bis(salilcilideno)-1,2-fenilenodiamina (Salofen), bem como sua atividade leishmanicida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Atividade antimicrobiana e antifúngica

A microbiota do corpo humano, em condições normais, não é patogênica ao hospedeiro. No entanto, durante o processo de infecção os microrganismos se multiplicam (RATTI; SOUSA, 2009) até ultrapassarem as defesas do corpo podendo ocasionar uma infecção crônica (MIMS et al, 2002; TRABULSI 2002; BONATO et al, 2007; SOUSA, 2014). As infecções podem ser adquiridas em vários ambientes, inclusive o hospitalar, com grandes índices de mortalidade e morbidade desenvolvendo um grande interesse da área médica (PESSOA, 2011).

Uma das bactérias mais isoladas de sítios infecciosos são os *Staphylococcus*. Este gênero é composto por 43 espécies, sendo o *Staphylococcus aureus* a espécie mais conhecida e associada a uma variedade de infecções como por exemplo furúnculos, síndrome do choque tóxico, endocardite, meningite, entre outros. Destacam-se também as espécies *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (PESSOA, 2011) como patógenos de importância clínica.

Outro grupo de bactérias comumente causadoras de infecções entéricas, sistêmicas e infecções hospitalares são as enterobactérias, tendo como principais agentes *Escherichia coli*, e algumas categorias diarreio gênicas que podem causar síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica. Outras categorias podem causar infecção alimentar, infecção do trato urinário entre outras. *Klebsiella* spp, *Proteus* spp., podem causar pneumonia, septicemia e infecção de feridas. *Salmonella* spp., pode causar febre tifoide, infecções entéricas, gastroenterites e septicemias (QUINN, 2011; HOLT et al, 1994). O gênero *Citrobacter* compreende espécies de *C. freundii*, *C. diversus* e *C. amalonaticus*, e são frequentemente isolados de espécimes clínicas como patógenos oportunistas.

Os antimicrobianos são compostos naturais, sintéticos ou semi-sintéticos que podem inibir o crescimento da célula bacteriana, os chamados bacteriostáticos, onde por sua maioria age inibindo a síntese proteica, como por exemplo as sulfonamidas, tetraciclina e macrolídeos. Por outro lado, os bactericidas, que matam e degradam a célula bacteriana, agem principalmente sobre a parede celular como os β -lactâmicos, membrana celular como a daptomicina ou ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano como as fluoroquinolonas. Porém alguns agentes que são bactericidas contra alguns microrganismos podem ser bacteriostáticos para outros ou vice-versa. Dentre os antimicrobianos, deve-se considerar também o potencial das drogas antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (WALSH 2003; LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011).

O pesquisador conhecido como o pai da quimioterapia, Paul Ehrlich, foi responsável pelo estabelecimento dos primeiros conceitos da ação de substâncias químicas agirem inibindo a proliferação microbiana em concentrações que ocasionariam efeitos colaterais mínimos ao hospedeiro (PATRICK, 2005).

Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, o salvarsan, usado contra a sífilis. Após 20 anos sem muito progresso, houve a introdução da proflavina em 1934 muito utilizada na segunda guerra mundial, porém o composto era muito tóxico e houve a necessidade de desenvolver agentes mais eficientes. Mesmo com todos estes avanços, o real marco na história do tratamento das infecções bacterianas foi a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (NICOLAOU; MONTAGNON, 2008).

Durante os anos de 1960 e 1980, foram lançados no mercado os antibióticos semisintéticos, derivados de protótipos naturais microbianos, como os derivados β -lactâmicos e análogos da tetraciclina (FERNANDES, 2006).

Durante a história da medicina, os medicamentos antimicrobianos vem revolucionando o tratamento de doenças infecciosas, porém, até o ano de 2009, os antibióticos eram vendidos livremente. Esta prática levou ao problema da automedicação e, conseqüentemente, a utilização errônea e inadequada por parte da população. Assim, por mecanismos de pressão seletiva, os microrganismos desenvolveram multirresistência (GAITE, 2008; WISE; PIDDOCK, 2010; BAIDEN et al, 2010; BRASIL, 2010; BARBIERI, 2017).

É de grande importância o conhecimento bioquímico e genético da resistência bacteriana para o melhor entendimento deste mecanismo. Entretanto já se conhecem alguns fatores como, por exemplo: i) a inativação do antibiótico geralmente produzida por enzimas bacterianas; ii) modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; iii) mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que causam a diminuição da concentração do antibiótico sem sua modificação química e transmissão do alvo. Desta forma, verifica-se que alguns patógenos são capazes de inativar determinada enzima e, conseqüentemente, ocorre a inibição de alguns antibióticos (WRIGHT, 2005; LAMBERT, 2005; BARBIERI, 2017).

A resistência bacteriana é de extrema importância porque é um problema mundial que atrai a atenção de diversos órgãos nacionais e internacionais como a ANVISA, OMS, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), associações de controladores de infecções hospitalares além da indústria farmacêutica internacional (BECKER; HU; BILLER-ANDORNO, 2006; HAMBRAEUS, 2006). No ano de 2006, um estudo publicado pela *Nature Biotechnology*, mostrou que desde 1998, apenas quatro antibióticos exibiram um novo mecanismo de ação, aprovados pela FDA. Este fato nos mostra que há cada vez mais a necessidade da conscientização no uso de antibióticos e incentivo para novas pesquisas na área para que não haja um retrocesso e retorno à era pré – antibiótica (KATZ, 2006).

Os testes de cultura e sensibilidade, fornecem atualmente resultados dentro de 36 a 48 horas, sendo que poucas infecções microbianas são confirmadas rapidamente para orientar nas decisões do tratamento. Essa ação, leva os médicos a prescreverem medicamentos de maneira presuntiva, ou seja, infecções virais são muitas vezes diagnosticadas como infecções bacterianas, podendo levar à prescrição de antibióticos erroneamente (FINCH, 2007; BARBIERI, 2017). Em 2004, apenas 1,6% dos fármacos em desenvolvimento nas maiores empresas farmacêuticas eram antibióticos, sendo que nenhum destes constituem medicamentos de nova geração. Esta escassez de novos antibióticos se deve em parte à natureza do mercado (OUTTERSON, 2009).

De acordo com Cooper e Shlaes (2011) o cenário para a descoberta, desenvolvimento e aprovação de novos antibióticos está em declínio e a OMS não descarta a possibilidade de um desastre devido a rápida e incontrolável resistência microbiana. Para que isto não ocorra é necessário que haja um esforço conjunto entre governo e indústria para o desenvolvimento rápido de novas drogas (SHLAES, 2011).

Devido aos dados citados acima relacionados à resistência microbiana, as infecções passam a representar uma ameaça, e os líderes da saúde pública estão alertando sobre o fato de que a medicina moderna está em risco devido a esta resistência emergente aos antibióticos (CHEN et al, 2009; WRIGHT, 2015), até mesmo nos países desenvolvidos. Segundo dados mundiais, as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente 30% das 56 milhões de mortes anuais (MADIGAN et al, 2004).

Além da resistência bacteriana, o que também tem gerado preocupações, são as resistências fúngicas com espécies de *Candida* principalmente ao triazol. Este tipo de infecção se tornou mais prevalente nos últimos anos (CHEN et al, 2012; AFRICA; ABRANTES, 2017) não somente em ocorrências mais também na gravidade da doença com o aumento de pacientes imunocomprometidos em estado crítico.

Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol e Anfotericina B são os fármacos mais utilizados para o tratamento da candidíase (GUALCO et al, 2007). Os três primeiro citados são derivados azólicos, compostos de três grupamentos amina, que atuam na inibição da síntese do ergosterol (SILVA, 2005; AFRICA; ABRANTES, 2017). Já a Anfotericina B atua ligando-se aos esteróis da membrana celular que resulta no extravasamento dos constituintes celulares e causando assim a morte celular (CASTRO et al, 2006).

As concentrações administradas de algumas destas drogas são relativamente altas, como por exemplo: a dosagem recomendada para o tratamento de candidíase com Miconazol é de 600 a 3600mg/kg; a dosagem administrada de Cetoconazol é de 200 a 800mg/kg ao dia; a dosagem para o Itraconazol é de 50 a 400mg/kg ao dia; o Fluconazol pode ser administrado via oral na dosagem de 200 a 400mg/kg ao dia (CASTRO et al, 2006).

A *Candida albicans* é a espécie mais isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes locais do corpo e é normalmente encontrada no mundo todo. É uma levedura que possui a capacidade de se aderir a diferentes mucosas e epitélios, possui dimorfismo com a capacidade de produção de estruturas filamentosas que auxiliam na invasão tissular, tem ótima termotolerância e produz enzimas como proteinases e fosfolipases. Assim, devido aos fatores citados acima, foi um microrganismo de escolha para estudo neste trabalho (SILVA et al, 2002; CASTRO et al, 2006).

Estudos com as bases de Schiff, vem sendo realizados na área biológica, e já se demonstrou que possui papel importante nos sistemas biológicos, pois apresentaram atividade anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitário, entre outros (AMIM et al, 2010; AZIZ et al, 2012; RONAD et al, 2010; SARAVANAN et al, 2010; HISAINDEE et al, 2015).

Devido a presença do anel aromático nas bases de Schiff, ocorre um aumento da lipofilicidade do composto, o que deve aumentar sua penetração na membrana bacteriana e fúngica. A ligação deste anel aromático deve diminuir a basicidade, o que faz com que suprima assim sua ligação com a molécula de DNA (HISAINDEE et al, 2015). O grupo imina também é responsável pela atividade antimicrobiana e vários estudos tem reportado que a presença de um par de elétrons isolados hibridizados na camada SP² do nitrogênio desempenha um papel químico e biológico significativo (TASNEEM et al, 2011).

Soleimam e colaboradores (2015), testaram alguns derivados da base de Schiff contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos e concluíram que as bactérias Gram positivas *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis* foram consideradas as mais sensíveis através da técnica de difusão em disco e nenhuma das testadas Gram negativas, apresentou zona de inibição forte (HISAINDEE et al, 2015).

Estes compostos tem sido apontados como agentes promissores, como por exemplo a N-(salicylidene)-2-hidroxyaniline, que é eficaz contra *Micobacterium tuberculosis* H37Rv, apresentando um valor de CIM de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nenhum efeito citotóxico foi verificado sobre macrófagos J774, mesmo quando testado em concentrações de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mais de 80% das células eram viáveis (SOUZA et al, 2007).

As bases de Schiff derivadas de isatina também foram descritas como possuindo uma elevada atividade antimicrobiana. Os valores de CIM contra *E. coli* NCTC 10418 foi de 2,4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, para *Vibrio cholerae* detectou-se 0,3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, para *Enterococcus faecalis* observou-se 1,2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e *Proteus shiguelloides* foi de 4,9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, enquanto os valores de CIM do Sulfametoxazol nas mesmas cepas bacterianas foram de 312-5000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (PANDEYA et al, 1999; JARRAHPOUR et al, 2007).

As bases de Schiff derivadas de isoniazida, foram ativas contra *Mycobacterium tuberculosis*, com um valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,03 mg/L. O

Índice de citotoxicidade (IC50) para este composto, contra células epiteliais de rim de macaco saudável, foi de até 1 g/ml, o que mostra que esta base de Schiff derivada de isoniazida é seletiva para células bacterianas (HEARN; CYNAMON, 2004).

Uma outra alternativa promissora e que nos leva a perspectivas futuras para este trabalho, são os testes biológicos com bases de Schiff complexadas com metais. Nair (2012), testou o CIM da base de Schiff complexada com Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) e concluiu que os ligantes tem efeito positivo na atividade antibacteriana e antifúngica. O complexo de Co(II) foi altamente ativo para todos os micróbios, o complexo de Cu(II) teve boa eficácia no intervalo de 10-23 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *C. albicans* e apresentou uma boa eficácia contra todas as cepas testadas com atuações em concentrações menores que 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (NAIR; ARISH; JOSEYPHUS, 2012).

Esta maior atividade dos complexos metálicos, pode ser devido ao efeito dos íons na membrana normal, pois eles possuem propriedades polares e não polares em conjunto, o que os torna adequados para a permeação em tecidos e células. Mudar a hidrofiliidade e lipofiliidade, diminui as barreiras de solubilidade e permeabilidade da célula. A lipofiliidade, que é responsável pelo controle de entrada de moléculas na célula, é modificada por coordenação e faz com que o complexo metálico seja mais eficiente que o ligando livre (FARREL, 2007). No entanto, isto não é uma regra; segundo Keypour (2013), trabalhos anteriores relataram que alguns derivados de diamina e de salicialdeído, tem uma atividade antibacteriana mais elevada que seus complexos (KEYPOUR et al, 2012).

Ainda sobre o estudo de Keypour (2013), foi testado a CIM de bases de Schiff complexadas com metais através da técnica de microdiluição em tubos a partir da concentração de 100 mg.ml^{-1} e os complexos testados mostraram ter melhor atividade antimicrobiana comparada a base de Schiff original (KEYPOUR et al, 2013).

2.2 Atividade leishmanicida

As doenças tropicais causadas por parasitas, expressam uma alta taxa de mortalidade e morbidade e infectam milhões de pessoas por todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (LOZANO et al, 2012; MURRAY et al, 2012; CHUA et al, 2017).

Os estudos envolvendo o parasita do gênero *Leishmania*, pertencente à família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, se tornam cada vez mais importantes, em consequência de sua urbanização. O parasita possui duas formas distintivas, onde, as encontradas nos vetores, são alongadas, possuem flagelo e são móveis. As encontradas no interior dos macrófagos de hospedeiros vertebrados, adquirem a forma esférica e não possui flagelo aparente (LAISON; SHAW, 1987; WHO, 2016).

Ao observar os casos registrados oficialmente, são diagnosticados por ano aproximadamente 58.000 casos de leishmaniose visceral em consequência 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* (STOCKDALE; NEWTON 2013; FEIJÓ et al, 2016; MARAN et al, 2016).

Devido a forma visceral apresentar alta taxa de mortalidade, ampla distribuição geográfica e a severidade de suas manifestações clínicas, quando a desenvolvem (MARQUES et al, 2016), a *L. infantum chagasi* será o foco de estudo deste trabalho.

2.2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é endêmica em 12 Países das Américas, e no período de 2001 a 2013 foram registrados 45.490 casos com média anual de 3.499 casos (OPS, 2015). Mundialmente, os países mais acometidos com mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral são Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2016). A OMS comunicou em 2012 que 310 milhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção por *Leishmania* em até 98 países ao redor do mundo (UZCANGA et al, 2017).

O parasita é transmitido através de picadas de moscas fêmeas de dípteros pertencentes à família *Psychodidae*, subfamília *Phebotominae*, conhecidos como flebotomíneos. Estas, tornam-se vetores da infecção ao se alimentarem de sangue infectado com *Leishmania* na forma amastigota de algum hospedeiro vertebrado (BANETH et al, 2008; MARQUES et al, 2016). Depois de ingeridas, as formas amastigotas passam por mudanças fisiológicas e morfológicas e são estimuladas a se diferenciar e dar origem as formas promastigotas, que é a fase infectante para o hospedeiro vertebrado (BARATA et al, 2005; SECUNDINO et al, 2005; BATES, 2007).

O período de incubação varia bastante, podendo ser de apenas 10 dias ou até 24 meses, com média de 2 a 6 meses (MS, 2006). A infecção é dada por um amplo espectro clínico podendo ser assintomático, na maioria os casos, e sintomático, onde a doença é progressiva e potencialmente fatal quando não tratada (PEARSON; SOUSA, 1996). Neste caso, a doença é expressa pela presença de sintomas como febre recorrente, palidez, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, plaquetopenia, vômitos e tosse seca (BRASIL 2011; OLIVEIRA et al, 2010). Ainda que existam medicamentos disponíveis no mercado para este tipo de infecção parasitária, a prevenção e o tratamento são difíceis em consequência dos efeitos colaterais ou não são eficazes devido aos parasitas resistentes aos fármacos (SUNDAR; CHAKRAVARTY 2015; TAKALA-HARRISON et al, 2015; CHUA et al, 2017).

É muito interessante desenvolverem-se estudos farmacológicas sobre moléculas que

apresentam propriedades biológicas, bem como seus derivados, que podem também ser úteis como agentes anti-parasitários (ANNANG et al, 2015; DAGNINO et al, 2015; DUARTE et al, 2016). Alguns tratamentos foram testados para detecção de efeito leishmanicida, explorando a resposta imune do hospedeiro contra *L. infantum chagasi*. Há esforços também no avanço e desenvolvimento de novos fármacos utilizando várias estratégias desde rastreio e identificação de novos alvos até a caracterização de fármacos já existentes no mercado, que exibem não somente atividade contra seu alvo específico, mas também contra o parasita (BENAIM et al, 2013; BENAIM et al, 2014; UZCANGA et al, 2017).

Dentre as opções de tratamentos existentes no mercado, é interessante avaliar o efeito de novas substâncias com potencial leishmanicida, por isso, no presente trabalho, a base de Schiff derivada de N,N'-bis(Salicilideno)-1,2-fenilenodiamina, foi testada como uma nova alternativa, sobre a forma promastigota do parasita *L. infantum chagasi*.

2.3 Bases de Schiff

As bases de Schiff são iminas ou compostos orgânicos que apresentam, pelo menos, um grupo $-R-C=N-$, onde em uma extremidade temos um grupo aromático e na outra extremidade qualquer outro grupo. Tais compostos são sintetizados a partir da condensação de um aldeído ou cetona e uma amina primária sob condições reacionais (BHAT et al, 1996).

Foram descobertas por Hugo Schiff em 1864, um pesquisador químico alemão nascido em Frankfurt, que trabalhava com reações de aldeídos, aminoácido, dentre outros, na Universidade de Florença, na Itália (TIDWELL, 2008; PAULO, 2011).

Segundo Tidwell (2008), o primeiro breve trabalho publicado por Hugo Schiff, foi intitulado “*A New Series of Organic Bases*” e a partir daí publicou mais de 300 artigos em várias línguas.

Estas bases, são alguns dos compostos orgânicos mais utilizados, como por exemplo, em pigmentos e corantes, catalisadores, intermediários em síntese orgânica e estabilizadores de polímeros (DHAR; TAPLOO, 1982; SILVA et al, 2011).

As iminas são espécies reativas susceptíveis à adição de reagentes nucleofílicos, ou seja, podem ser utilizadas como intermediários químicos sintéticos e também em química de coordenação por formar complexos estáveis com vários metais de transição (HOLM; EVERETT Jr; CHAKRAVORTY, 1966; ESTEVES-SOUZA et al, 2004; VIGATO; TAMBURINI, 2004). Elas estão presentes em vários compostos naturais, derivados naturais e não naturais. O grupo imina nestes compostos, mostra-se promissor e vários estudos estão sendo focados em suas atividades biológicas (BRINGMANN et al, 2004; GUO et al, 2007; LI et al, 2014).

Uma nova aplicação de iminas e de grande potencial, se deu após o isolamento de difenilcetona, a primeira cetona em 1905. Hermann Staudinger, em 1907, reagiu este composto com bases de Schiff, e assim produziu o primeiro β -lactâmico sintético (SHRINER et al, 2004; TIDWELL, 2008). A reação de iminas com cetonas formando os β -lactâmicos, foi descoberta a pouco mais de 100 anos, bem antes dos produtos químicos e química medicinal serem reconhecidos. Por isto, esta reação permaneceu pouco utilizada até a descoberta do antibiótico Penicilina (TIDWELL, 2008).

Neste trabalho foi estudada a base de Schiff N,N'-bis(Salicylidene)-1,2-phenylenediamine, também chamada de Salofen (figura 1). Seus cristais possuem estrutura monocíclica e possui propriedades físicas e químicas que já estão estabelecidas na literatura (TOLEDO, 2015).

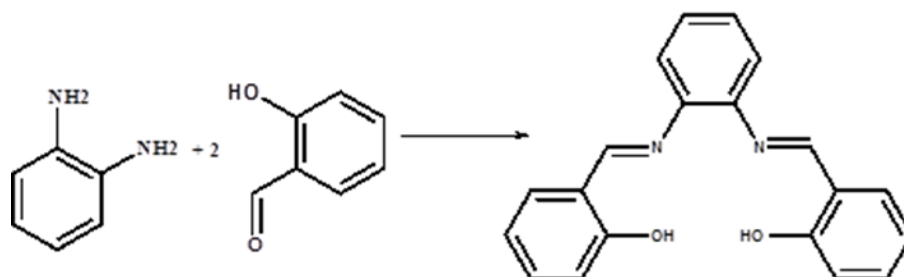


Figura 1 – Esquema da reação química para a obtenção da base Schiff Salofen.

Fonte: Prof. Dr. Thiago Andrade de Toledo.

Segundo Toledo (2016), esta estrutura cristalina é estável sob diferentes temperaturas, demonstrado através de curvas DTA centrada em 485 K e DSC centrada em 484 K, o que facilita o estudo do mesmo na área biológica, pois suporta autoclave sem degradação. O mesmo estudo ainda testou o efeito da Salofen com antibióticos, e a ação da amicacina foi melhorada na presença do produto, ou seja, possui um potencial efeito sinérgico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de materiais orgânicos derivados da base de Schiff N,N'-bis(salilcilideno)-1,2-fenilenodiamina (Salofen) em relação à atividade antimicrobiana e leishmanicida.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* utilizando os testes de difusão em ágar e ensaios de microdiluição para diferentes concentrações da base de Schiff Salofen, sobre espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse à saúde pública e uma espécie de fungo leveduriforme potencialmente patogênico.
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de diferentes concentrações da base de Schiff Salofen, contra *Leishmania infantum chagasi* (cepa sensível ao óxido nítrico - NO) utilizando o método colorimétrico do Alamar Blue em 24 e 48 horas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização da molécula

A base de Schiff Salofen, foi sintetizada pelo Prof. Dr. Thiago Andrade de Toledo no laboratório de Química da Universidade de Cuiabá, campus Barão, Cuiabá, MS. O material foi preparado através da condensação de 1,2-fenilenodiamina (20 mmol) e salic aldeído (10 mmol) em solução etanólica (40 mL) sob aquecimento constante a 60°C e agitação magnética por duas horas. O resultado foi a formação de um pó de cor amarela observado na Figura 2.



Figura 2 – Aspecto do Salofen durante a produção.
Fonte: Prof. Dr. Thiago Andrade de Toledo.

4.2 Microrganismos

Os microrganismos não listados foram obtidos a partir da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da UFSCar. Os Gram positivos, selecionados para este estudo, foram: *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Dentre os Gram negativos utilizou-se: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus* spp, *Citrobacter freundii* e *Salmonella* spp (ATCC 19196). O fungo leveduriforme selecionado foi *C. albicans* e o parasita utilizado foi *L. infantum chagasi*.

4.3 Determinação da atividade antimicrobiana

4.3.1 Difusão em ágar

Foram inoculados 200 µl das cepas bacterianas e leveduriforme em 5 ml de caldo infusão cérebro-coração (BHI – HIMEDIA) para reativação. Os mesmos foram incubados em estufa à 37 °C por 24 horas. Após este período, os microrganismos foram plaqueados em triptona soja ágar (TSA) (HIMEDIA, BR) e incubados em estufa à 37 °C por 24 horas. Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*, o método utilizado foi difusão em ágar (NUNAN, et al, 1985; NCCLS, 2000).

O inóculo foi padronizado, transferindo-se os microrganismos com o auxílio de uma alça bacteriológica de 10µl para um tubo com solução salina (NaCl) 0,9% esterilizada até atingir a turbidez de 0,5 na escala de MC Farland ($1,5 \times 10^8$ para bactérias e $1,5 \times 10^6$ para leveduras) verificada em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-22) no comprimento de onda a 620 nm.

Foram retirados 200 µl desta suspensão e semeados com auxílio de um swab esterilizado em ágar Mueller – Hinton (MH) (KASVI, BR) utilizando-se duas placas por microrganismo. Em seguida, foram feitos três poços de 5 mm de diâmetro por placa e adicionado a cada poço 50 µl de Salofen nas concentrações $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ estudadas. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 horas. Após este tempo, os halos formados foram medidos com paquímetro (mm), e considerou-se o diâmetro total, incluindo o do poço. Como controle negativo foi utilizado o solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) 3% e como controle positivo foram utilizados discos de antibióticos (SENSIBI-DISC – CECON).

4.3.2 Ensaios de microdiluição

O método de diluição em meio líquido, é o que apresenta metodologia mais complexa, entretanto é o mais preciso (RIOS et al, 1988). Existem vários métodos para realização deste teste; o utilizado neste trabalho foi a diluição em placa de microtítulo (VANDEN BERGHE; VLIETINCK 1991).

O inóculo foi padronizado, transferindo-se colônias dos microrganismos para salina 0,9% até atingir a turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$), verificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm para bactérias. Para a levedura a leitura foi feita em 530 nm. Foi realizada uma diluição 1:10 em CMH (KASVI) para obter uma suspensão bacteriana de $1,0 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e para levedura, realizou-se uma diluição 1:100 e depois 1:20 para obtenção de uma suspensão de $2,5 \times 10^3$ UFC em meio RPMI (SIGMA ALDRICH, EUA).

A diluição seriada do composto, foi feita em tubos de 50 mL (KASVI, BR) e depois adicionado nos poços da placa. As concentrações testadas foram de 2500, 1250, 625, 312 e 156 $\mu\text{g/mL}$.

Após o preparo das diluições, o passo seguinte foi preencher a microplaca de 96 poços de acordo com o mapa apresentado na figura 3.

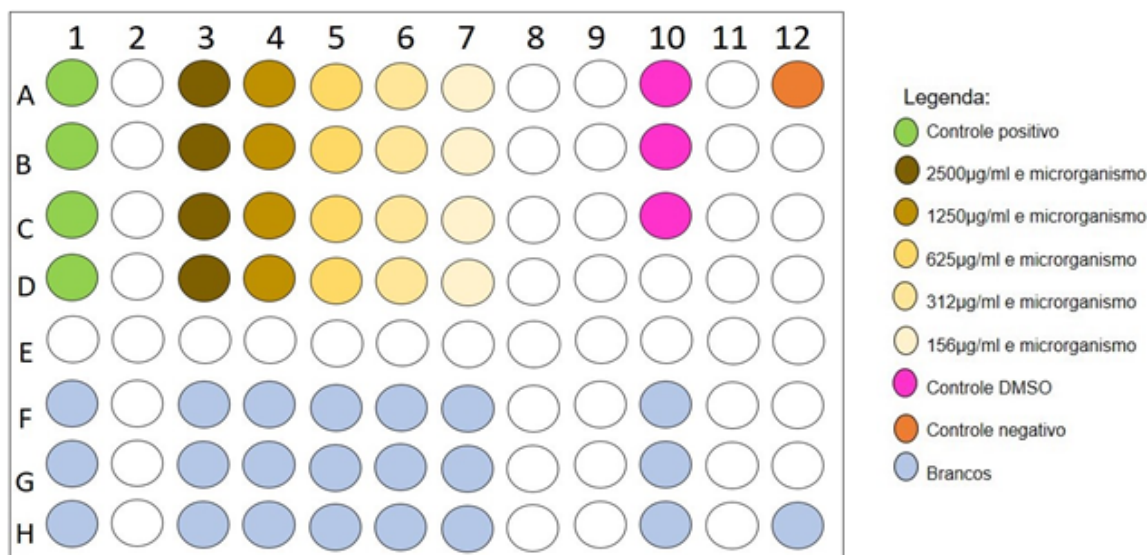


Figura 3 – Mapa da microplaca de 96 poços para o teste de microdiluição. Este esquema foi utilizado para todas as cepas testadas.

Fonte: Acervo Pessoal.

Nos poços do controle positivo, adicionou-se 100 μl da suspensão de microrganismos e 100 μl de caldo MH para bactérias e RPMI para levedura; Nos poços de teste do composto, adicionou-se 100 μl da diluição desejada e 100 μl da suspensão de microrganismo; Nos orifícios para teste de controle do solvente, adicionou-se 100 μl da suspensão de microrganismo e 10% de DMSO que foi a concentração mais alta utilizada e para o teste com levedura utilizou-se ainda Tween 80 à 1%; No orifício do controle negativo, adicionou-se 100 μl da suspensão de microrganismo e 100 μl de penicilina e estreptomicina. Os brancos contém todos os componentes dos orifícios citados, exceto o microrganismo.

A microplaca foi incubada em estufa à 37 °C por 24 horas para bactérias e em *shacker* à 37 °C sob agitação de 100 rotações por minuto (rpm) por 48 horas para levedura. Após o período de incubação, foram adicionados 20 μl do revelador resazurina (Alamar Blue®) (SIGMA-ALDRICH, EUA) a 0,01% diluída em tampão fosfato salino (PBS) em cada orifício. O tempo de espera para a redução da resazurina (cor azul) para resorufina (cor rósea) foi de 60 min +/- 20 min. Em seguida as placas foram submetidas a leitura de absorvância a 540nm, em espectrofotômetro de fluorescência (SPECTRAMAX M3).

4.4 Determinação da atividade leishmanicida

As cepas de *L. 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 (figura 4), 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.

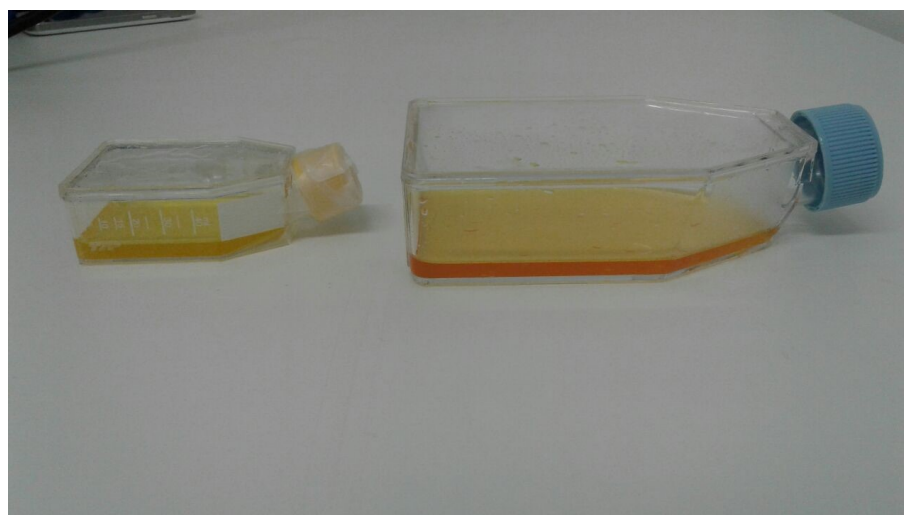


Figura 4 – Células de *Leishmania infantum chagasi* em frasco T.
Fonte: Acervo Pessoal.

A Figura 5 apresenta as formas promastigotas da *L. infantum chagasi* na sua configuração individual (Fig.5A) ou de rosetas (Fig.5B) quando se encontram unidas entre elas pelo corpo celular ou pelo flagelo (SIFAQUI et al, 2014).

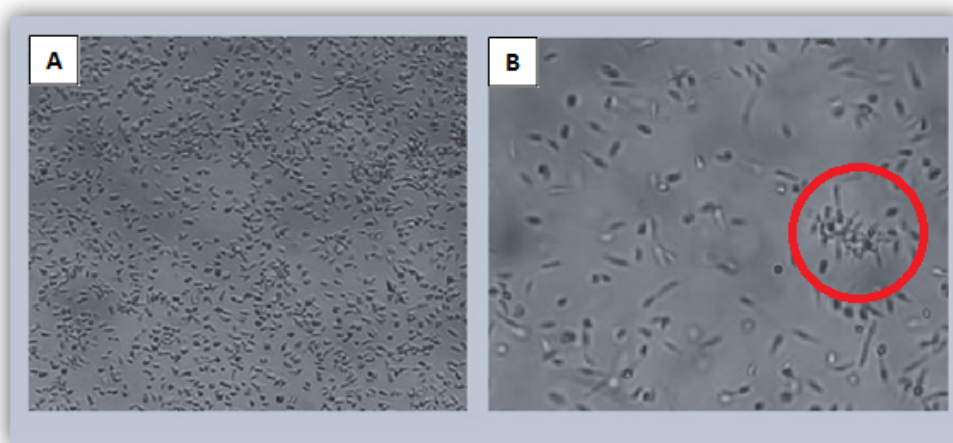


Figura 5 – Formas promastigotas da *L. infantum chagasi*. (A) Configuração individual - objetiva 20x; (B) Configuração de rosetas - objetiva 40x. Visualização feita através de microscópio ótico.

Fonte: Acervo Pessoal.

Na determinação da atividade leishmanicida foram realizados dois experimentos. No primeiro foram testadas concentrações de 1 mg.mL^{-1} , $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 5 mg.m^{-1} , 10 mg.m^{-1} e 15 mg.m^{-1} . No segundo, testaram-se concentrações de 1 mg.mL^{-1} , $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 2 mg.mL^{-1} , $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 3 mg.mL^{-1} , $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e 10 mg.mL^{-1} . O composto foi diluído em meio 199 e Tween 80 à 1%.

A concentração celular utilizada foi de 1×10^5 cels/mL, e a partir desta diluição, pipetou-se 100 μl nos orifícios da microplaca e 100 μl das diluições do composto. Nos orifícios 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 $23 \text{ }^\circ\text{C}$ (SIFA-OUI et al, 2014), por 24 e 48 horas em shacker a 90 rpm. Os mapas das placas utilizados nos experimentos estão representados nas figuras 6 e 7.

Após o primeiro período de 24 horas, utilizou-se novamente a resazurina para o teste colorimétrico, onde pipetou-se nos poços 20 μl do corante diluído em água ultrapura tipo Milli-Q 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 CO_2 mantida entre 5 e 10% com o auxílio de uma vela.

A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro (TP-READER NM-THERMO PLATE) no comprimento de onda de 650 nm.

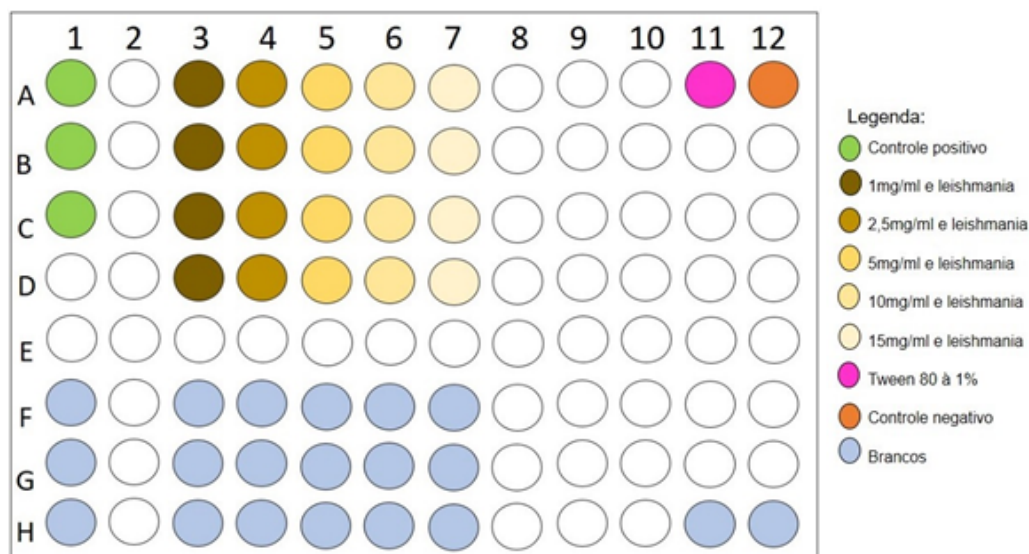


Figura 6 – Mapa da placa utilizado no primeiro experimento com *Leishmania infantum chagasi*.

Fonte: Acervo Pessoal.

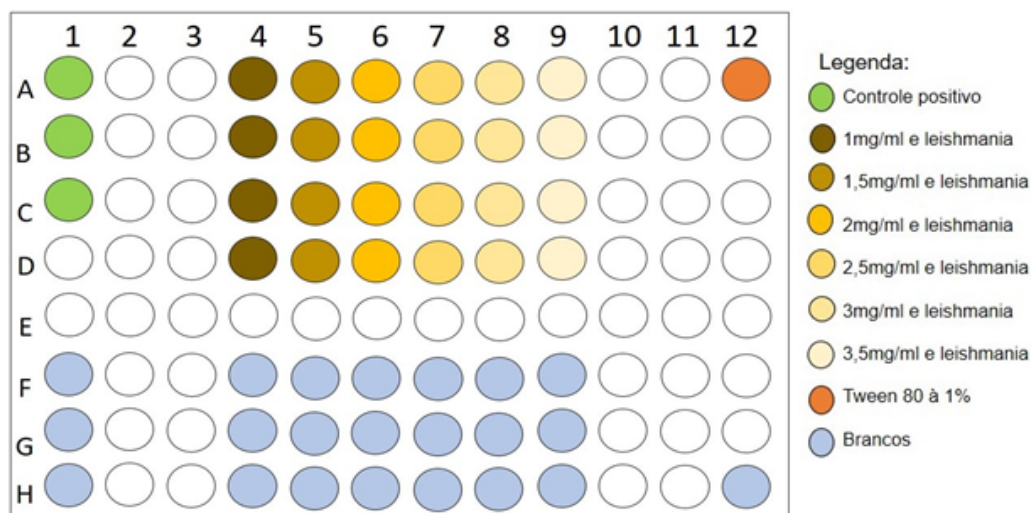


Figura 7 – Mapa da placa utilizado no segundo experimento com *Leishmania infantum chagasi*.

Fonte: Acervo Pessoal.

4.5 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 e para o cálculo da IC50 (utilizando uma curva de regressão linear), foi utilizado o *software* Origin Pro versão 9.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da atividade antimicrobiana

5.1.1 Teste de difusão em ágar

Foram selecionadas três concentrações, 25mg.mL⁻¹, 35 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹, que foram diluídas em DMSO. A *C. albicans* foi o microrganismo que apresentou a maior média de halo em todas as concentrações e *Proteus* spp o que apresentou a menor média de halo nas concentrações testadas, indicando uma menor sensibilidade ao Salofen. Os demais microrganismos indicaram média ou alta sensibilidade ao composto ao observar os halos. Os valores das médias de halos dos microrganismos testados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Determinação das médias dos halos (mm) dos testes de difusão em ágar nas concentrações de 25 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹; Desvio padrão (DP); (x) sem resultados.

Microrganismo	25 mg.mL ⁻¹		50 mg.mL ⁻¹	
	Média	DP	Média	DP
<i>E. coli</i>	17,87	0,85	18	1,26
<i>E. faecalis</i>	13,16	0,4	21	0,63
<i>S. saprophyticus</i>	20,16	2,04	21,16	0,98
<i>S. aureus</i>	20,66	1,21	21,5	3,5
<i>B. subtilis</i>	13,66	0,51	23,16	1,47
<i>Salmonella</i> spp	12,83	1,32	17,66	1,63
<i>S. epidermidis</i>	14,83	0,4	22,16	1,6
<i>C. freundii</i>	15	1,78	13	1,54
<i>Proteus</i> spp	10,66	1,03	14,5	0,54
<i>c. albicans</i>	31,6	2,06	29,83	1,16

A Figura 8, apresenta imagens fotográficas, demonstrando os halos obtidos a partir dos ensaios de difusão em ágar com os microrganismos *S. aureus*, *C. albicans* e *Salmonella* spp.

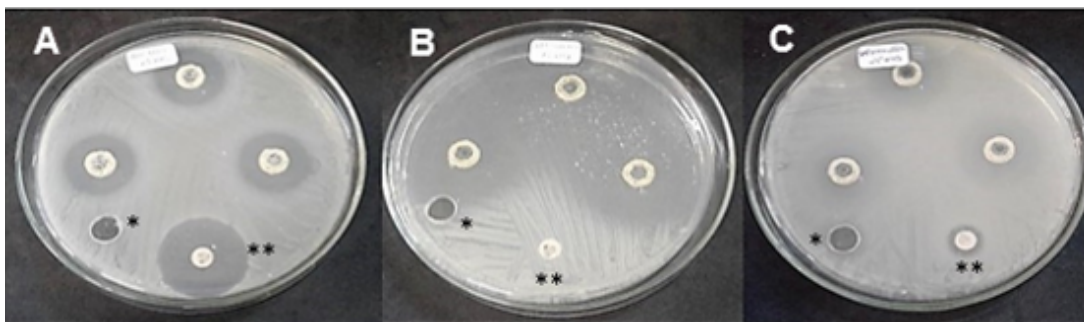


Figura 8 – Imagem fotográfica de alguns ensaios de difusão em ágar de concentrações de salofen, sendo: A) *S. aureus* 25 mg.m⁻¹ B) *C. albicans* 25 mg.mL⁻¹ C) *Salmonella* 25 mg.mL⁻¹.(*) Controle DMSO; (**) Controle positivo.

Os ensaios foram realizados em sextuplicata, ou seja, utilizou-se duas placas por microrganismo, onde foram feitos três poços por placa para o teste das concentrações do composto, e os seis poços testados por microrganismo, expressaram resultados semelhantes ou iguais entre si. O poço feito para o controle do solvente (DMSO), demonstrou que o mesmo não inibiu qualquer microrganismo estudado, como pudemos observar acima.

Na figura 9, observa-se a demonstração comparativa entre microrganismos, concentrações e halos (mm).

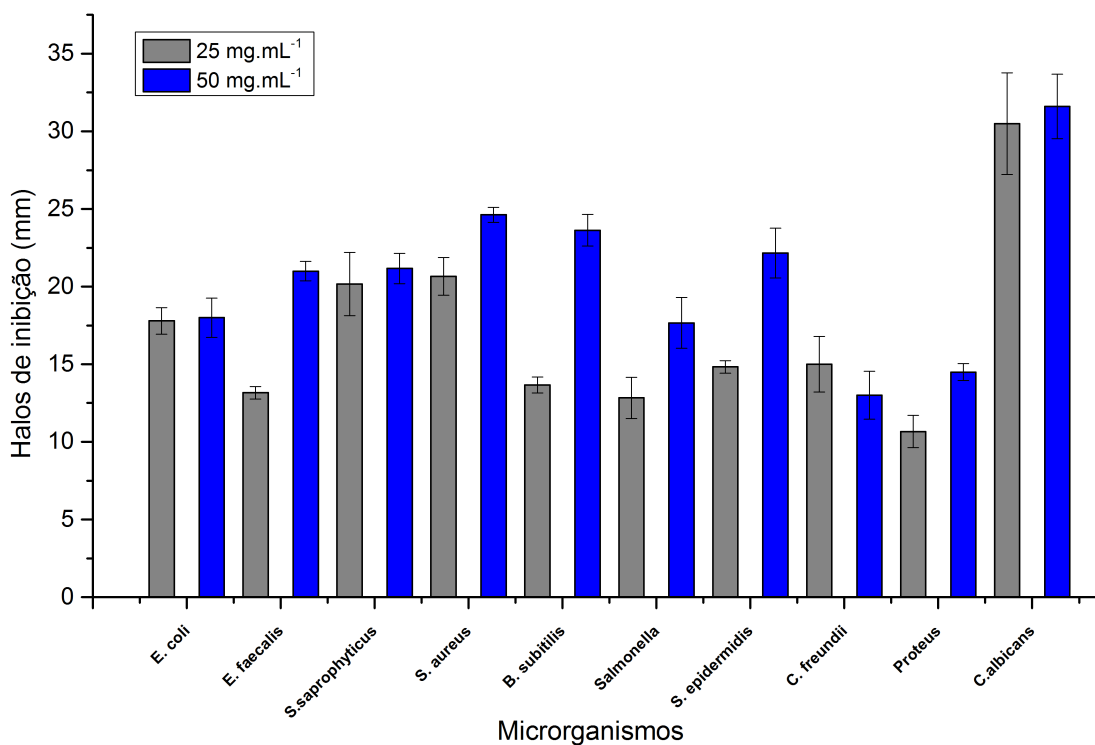


Figura 9 – Gráfico comparativo dos halos (mm) formados de acordo com as concentrações do salofen e os microrganismos testados.

A figura 10 apresenta as comparações estatísticas com diferenças significativas

entre as diferentes concentrações da base de Schiff Salofen e o antibiótico Gentamicina $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a 4 cepas bacterianas.

Em (A), note-se que para *Salmonella* spp. a concentração de 25 mg.mL^{-1} apresenta diferenças significativas no rendimento com as concentrações 35 mg.mL^{-1} , 50 mg.mL^{-1} e Gentamicina, enquanto que a concentração de 50 mg.mL^{-1} apresenta um rendimento mais eficiente que a Gentamicina. Em (B), podemos observar que para *E. faecalis* a concentração de 50 mg.mL^{-1} , tem um rendimento mais eficiente que as outras concentrações e o antibiótico. Em (C), para *B. subtilis* o rendimento da concentração de 25 mg.mL^{-1} foi diferente das outras duas testadas e do antibiótico. É importante mencionar que a concentração de 50 mg.mL^{-1} , teve um rendimento mais eficiente que as outras concentrações e o antibiótico. Em (D), para *S. epidermidis* a concentração de 50 mg.mL^{-1} apresenta um rendimento mais eficiente que as concentrações menores e um rendimento sem diferenças significativas com o antibiótico Gentamicina.

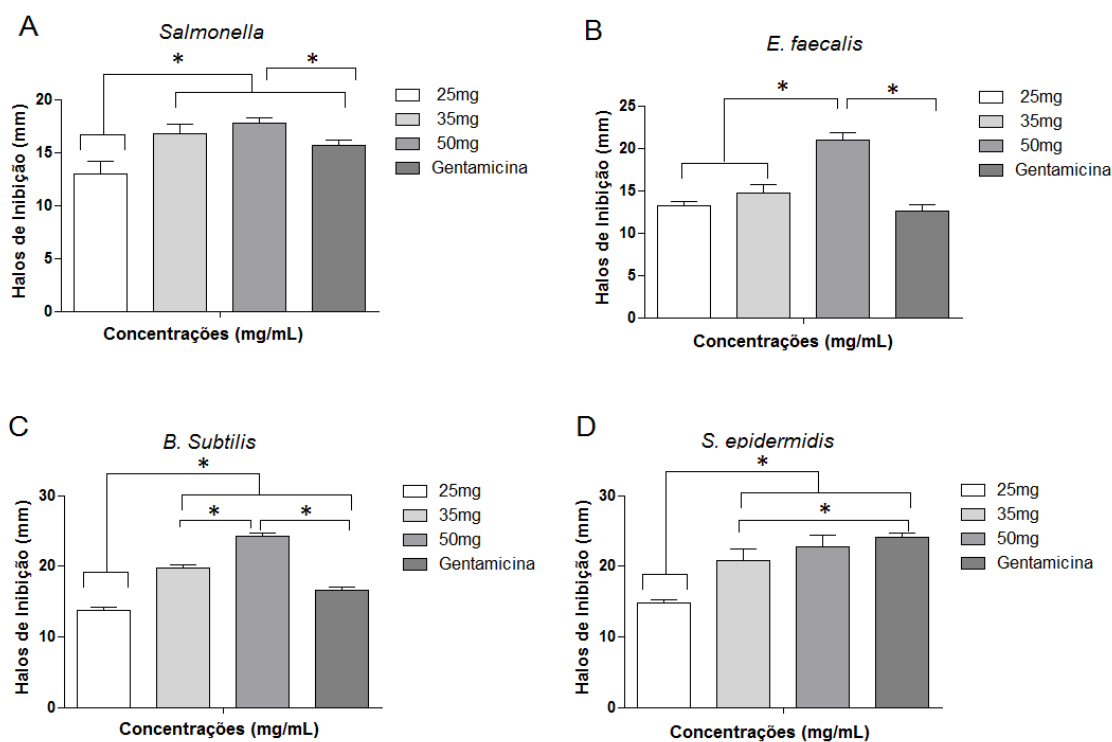


Figura 10 – Halos de inibição (mm) utilizando-se concentrações de 25 mg.mL^{-1} , 35 mg.mL^{-1} e 50 mg.mL^{-1} da base de Schiff Salofen e Gentamicina frente a A) *Salmonella* spp. B) *E. faecalis*. C) *B. subtilis*. D) *S. epidermidis*. (*) $p < 0.05$ entre os grupos comparados pelas setas.

5.1.2 Ensaios de microdiluição

Os resultados dos ensaios de microdiluição das concentrações da base de Schiff Salofen, foram representados em gráficos de emissão da fluorescência para cada bactéria.

A partir destes gráficos, nota-se que quanto maior a fluorescência emitida, mais células viáveis foram detectadas.

Na Figura 11, são apresentados dois eixos de fluorescência para comparação dos resultados das diluições frente ao controle, uma vez que a fluorescência emitida pelo mesmo é muito maior, próximo de 25.000 (AU). As emitidas pelas concentrações testadas atingiram o máximo de 2.000 (AU) para este microrganismo.

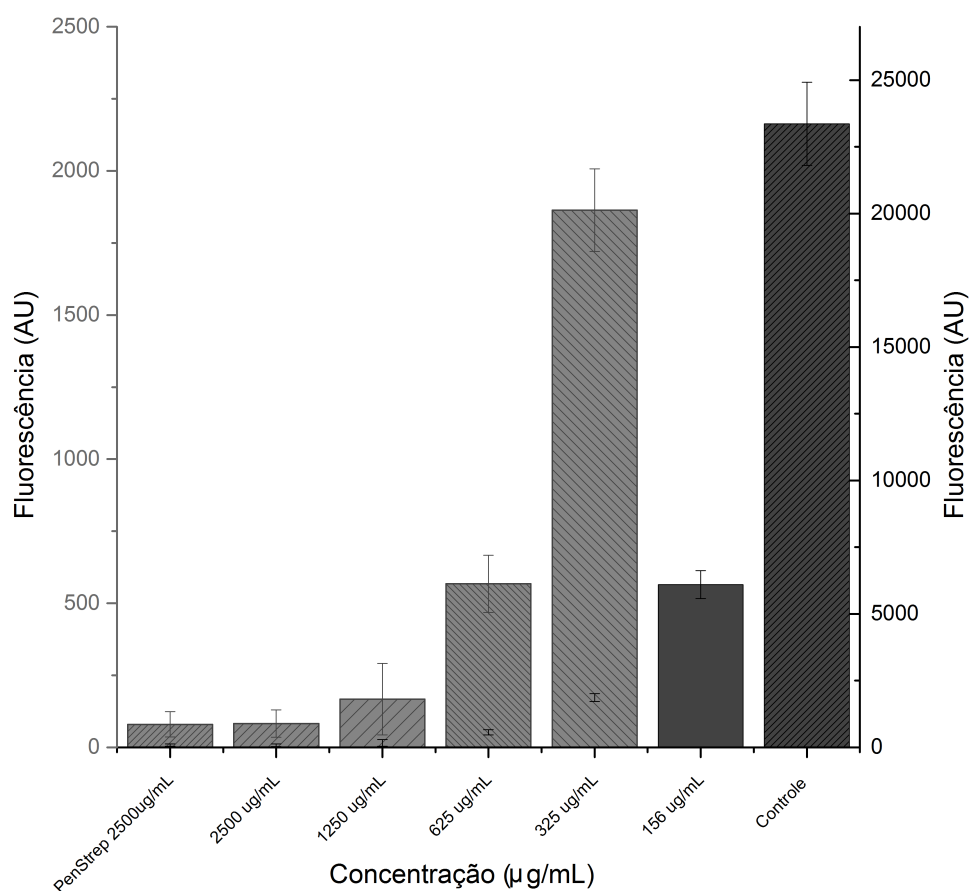


Figura 11 – Gráfico de emissão de fluorescência para *Salmonella* spp. São apresentados dois eixos Y de fluorescência para melhor comparação dos resultados das diluições da base de Schiff Salofen frente ao controle. As barras pretas seguem o eixo da direita e as barras cinzas seguem o eixo da esquerda.

Ao comparar as concentrações testadas com o controle, podemos deduzir que houve inibição em todas elas, sendo as duas primeiras, iguais ou próximas a fluorescência emitida pelo antibiótico. A concentração de 625 µg.mL⁻¹ apresentou fluorescência de 500 (AU) e a de 325 µg.mL⁻¹ um pouco acima de 1500 (AU). A concentração de 156 µg.mL⁻¹ foi a que menos inibiu, com a fluorescência um pouco acima de 5000 (AU), porem ainda muito abaixo da emitida pelo controle.

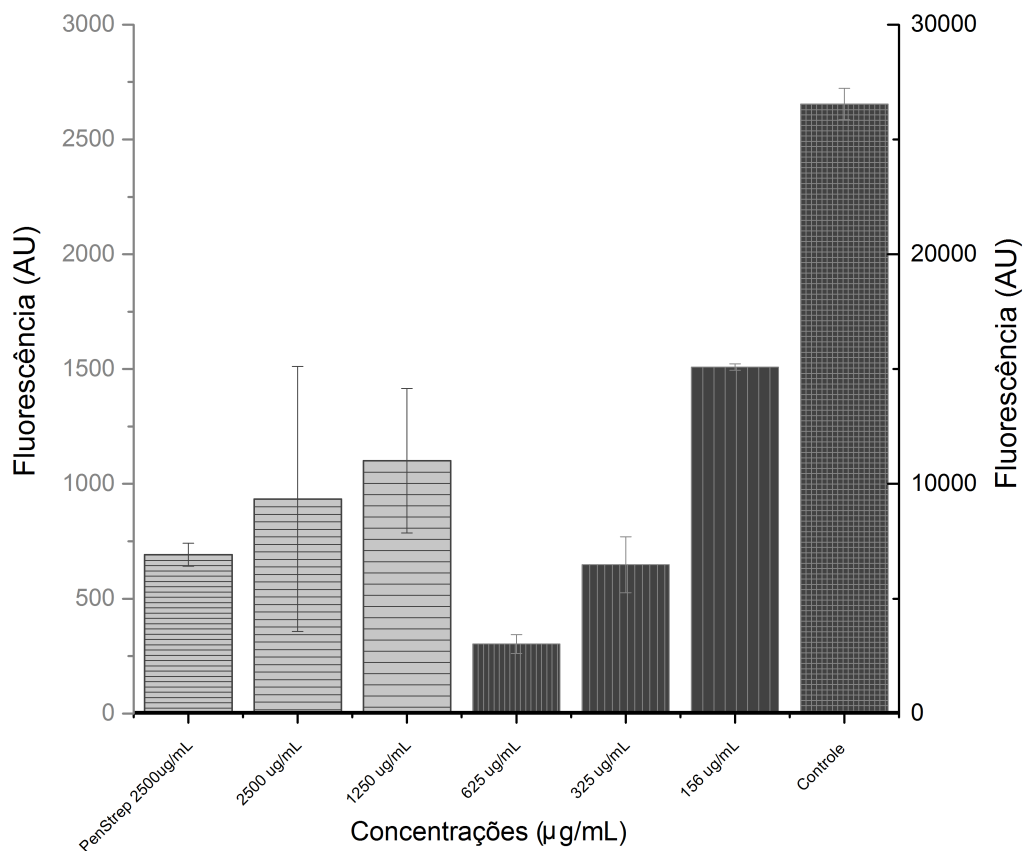


Figura 12 – Gráfico de emissão de fluorescência para *C. freundii*. São apresentados dois eixos Y de fluorescência para melhor comparação dos resultados das diluições da base de Schiff Salofen frente ao controle. As barras pretas seguem o eixo da direita e as barras cinzas seguem o eixo da esquerda.

Na Figura 12, a fluorescência emitida pelo controle é muito maior, passando de 25.000 (AU). As emitidas pelas concentrações testadas ficaram próximas de 1.000 (AU) para este microrganismo.

Ao comparar com o controle, podemos deduzir que houve inibição em todas as concentrações testadas, sendo a primeira e a segunda, perto de 1000 (AU). A concentração de 625 µg.mL⁻¹ apresentou fluorescência menor que 5000 (AU) e a de 325 µg.mL⁻¹ um pouco acima de 5000 (AU). A concentração de 156 µg.mL⁻¹ foi a que menos inibiu, com a fluorescência perto de 15000 (AU), porem ainda abaixo da emitida pelo controle.

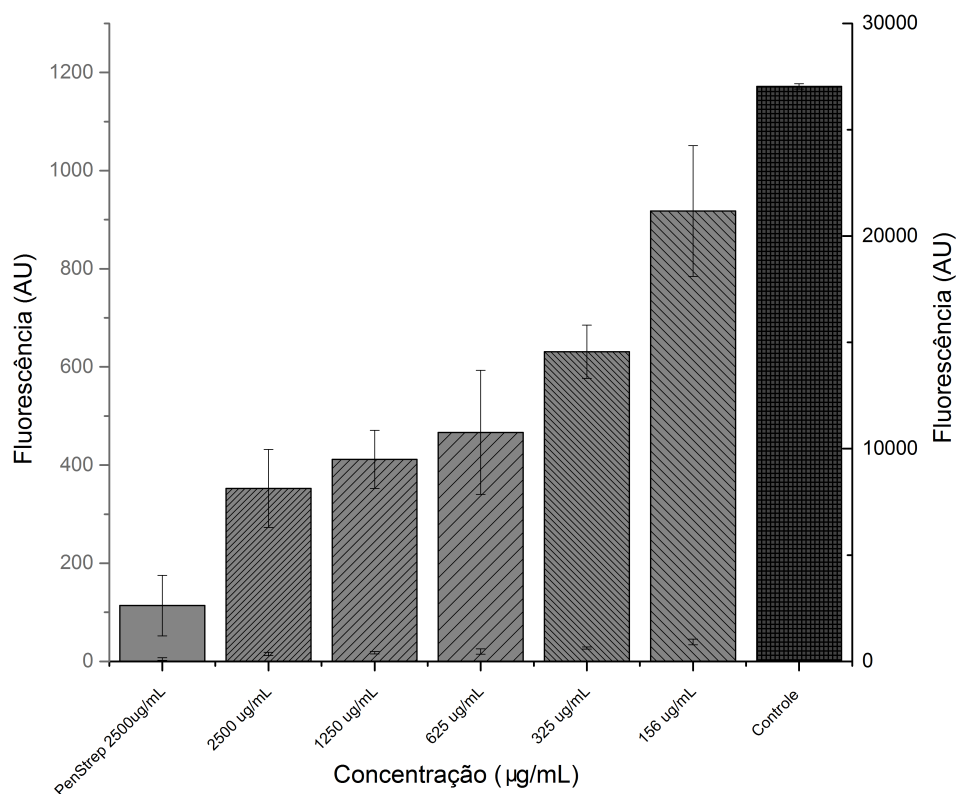


Figura 13 – Gráfico de emissão de fluorescência para *S. aureus*. São apresentados dois eixos Y de fluorescência para melhor comparação dos resultados das diluições da base de Schiff Salofen frente ao controle. As barras pretas seguem o eixo da direita e as barras cinzas seguem o eixo da esquerda.

Na Figura 13, a fluorescência emitida pelo controle é muito maior, passando de 25.000 (AU). As emitidas pelas concentrações atingiram o máximo de 900 (AU) para este microrganismo.

Ao comparar com o controle, podemos deduzir que houve inibição em todas as concentrações testadas, sendo as duas primeiras, perto de 400 (AU). A concentração de 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ perto de 500(AU) e a de 325 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ muito próxima de 600 (AU). A concentração de 156 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que menos inibiu, com a fluorescência próxima de 900 (AU), porem ainda muito abaixo da emitida pelo controle.

Ao comparar com o controle, podemos deduzir que houve inibição em todas as concentrações testadas, sendo a primeira, perto de 800 (AU). A segunda concentração emitiu fluorescência perto de 0 (AU), bem menos que a emitida pelo antibiótico, que ficou por volta de 250 (AU) e a de 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ também emitiu menos fluorescência que o antibiótico, ficando abaixo de 200 (AU). A concentração de 325 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 156 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ emitiram fluorescência próxima de 400 (AU), porem ainda muito abaixo da emitida pelo controle.

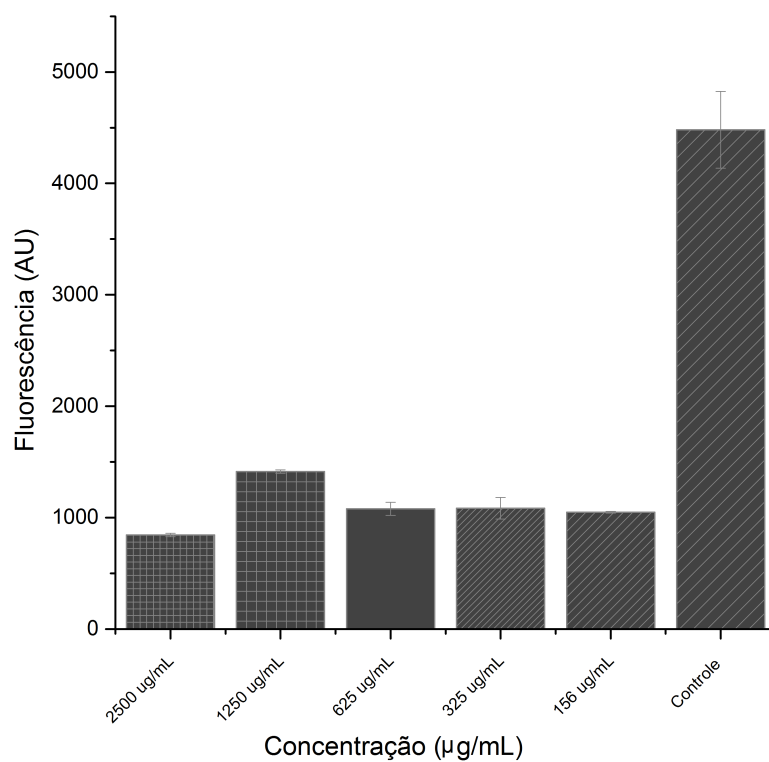


Figura 14 – Gráfico de emissão de fluorescência para o microrganismo *S. epidermidis*.

Na figura 14, ao comparar com o controle, podemos deduzir que houve inibição em todas as concentrações testadas, sendo a primeira, abaixo de 1000 (AU). A segunda concentração emitiu fluorescência perto de 1500 (AU), as três últimas emitiram fluorescência semelhante, próximas de 1000 (AU), muito abaixo da emitida pelo controle, acima de 4000 (AU).

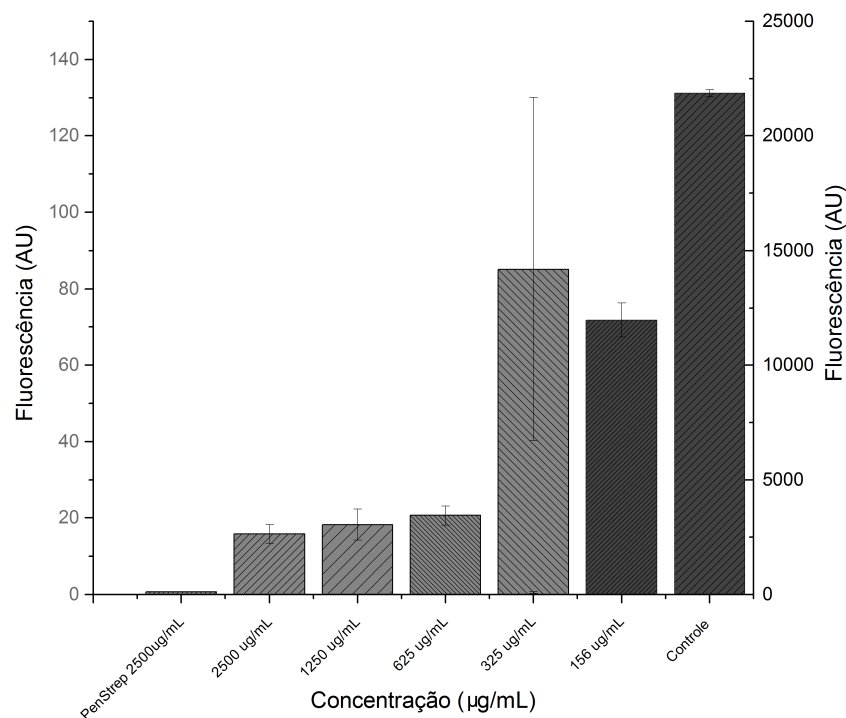


Figura 15 – Gráfico de emissão de fluorescência para *B. subtilis*. São apresentados dois eixos Y de fluorescência para melhor comparação dos resultados das diluições da base de Schiff Salofen frente ao controle. As barras pretas seguem o eixo da direita e as barras cinzas seguem o eixo da esquerda.

Na Figura 15, a fluorescência emitida pelo controle é muito maior, passando de 20000 (AU). As emitidas pelas concentrações testadas ficaram próximas de 20 (AU) para este microrganismo.

Ao comparar com o controle, podemos deduzir que houve inibição em todas as concentrações testadas, sendo as três primeiras, perto de 20 (AU). A concentração de 325 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ emitiu fluorescência próximo de 80 (AU). A concentração de 156 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ emitiu fluorescência acima de 10000 (AU), porém ainda abaixo da emitida pelo controle.

Para melhor avaliação da inibição bacteriana pela atividade do salofen, demonstrou-se a porcentagem de inibição em dois grupos, as bactérias Gram negativas e Gram positivas. A Figura 16 mostra a porcentagem de inibição bacteriana nas concentrações de 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ até 156 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Salmonella* spp e *C. freundii*.

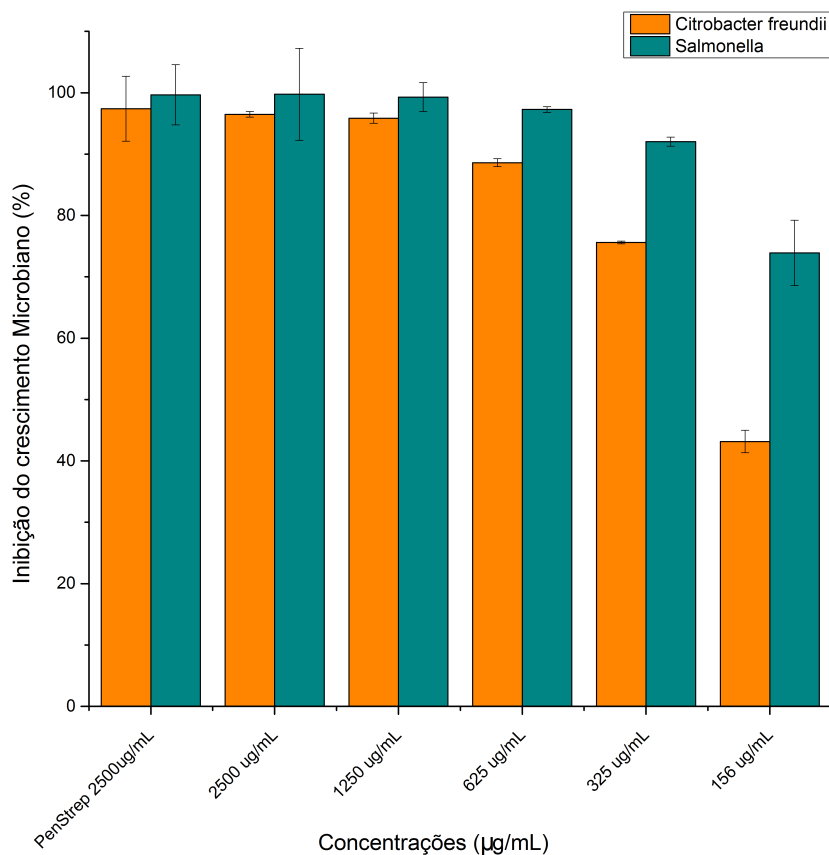


Figura 16 – Gráfico da porcentagem de inibição de bactérias Gram negativas *C. Freundii* e *Salmonella* spp frente a concentrações da base de Schiff Salofen.

A figura 16, mostra os resultados obtidos através das microdiluições das Gram negativas, que alcançaram quase 100% de inibição para *Salmonella* spp nas três primeiras concentrações e as duas últimas inibiram acima de 50%. Com relação ao *C. freundii* houve inibição de mais de 90% para as duas primeiras concentrações, acima de 80% para a concentração de 625 µg.mL⁻¹ e mais de 70% para a seguinte. A última concentração ficou abaixo de 50%. As primeiras barras expressam o antibiótico comercial utilizado na concentração de 2500 µg.mL⁻¹.

A figura 18, apresenta os resultados das porcentagens de inibição obtidos através das microdiluições contra bactérias Gram positivas.

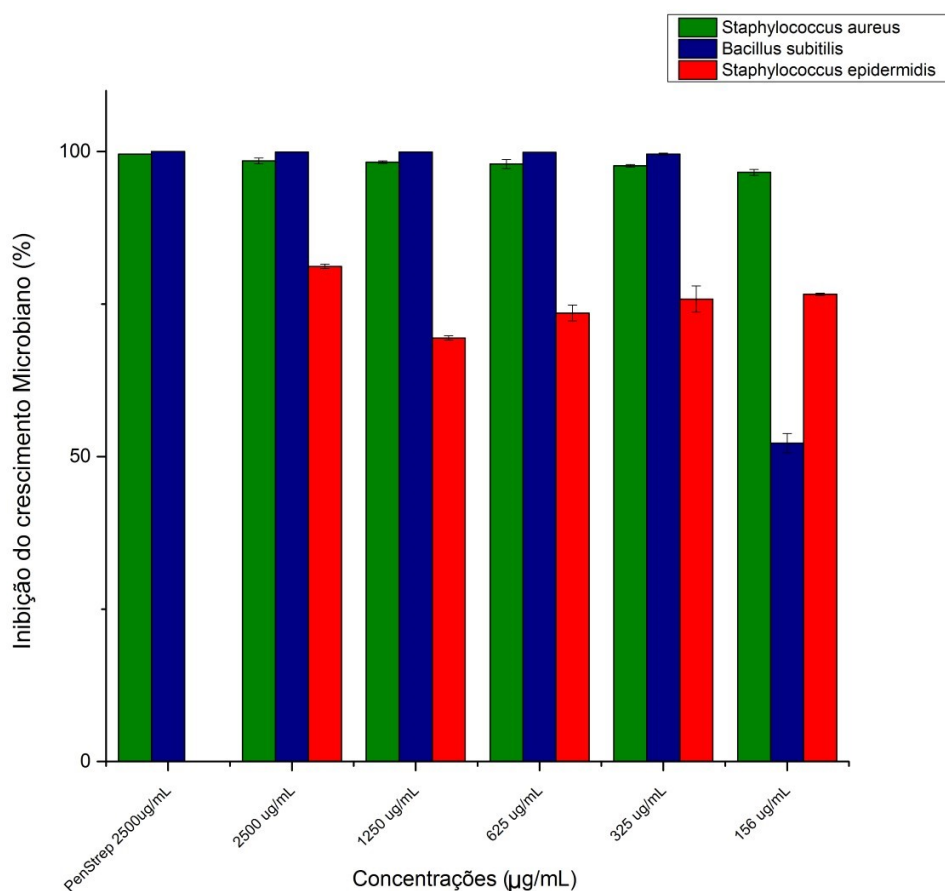


Figura 17 – Gráfico da porcentagem de inibição de bactérias Gram positivas *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* frente a concentrações da base de Schiff Salofen.

Na figura 17, observam-se os resultados obtidos através das microdiluições das Gram positivas, que alcançaram quase 100% de inibição para *S. aureus* nas quatro primeiras concentrações e a última inibiu acima de 90%. Com relação ao *B. subtilis* houve inibição acima de 90% para as quatro primeiras concentrações e a última concentração ficou abaixo de 50%. Com relação ao *S. epidermidis*, observa-se que a primeira concentração inibiu próximo a 80%, a segunda abaixo de 70% e as três últimas acima de 70%. As primeiras barras expressam o antibiótico comercial utilizado na concentração de 2500 µg.mL⁻¹.

5.2 Atividades in vitro da base de Schiff Salofen contra a forma promastigota de *Leishmania infantum chagasi*

A figura 18 apresenta a absorvância obtida através da leitura em espectrofotômetro para *L. infantum chagasi*, nas cinco concentrações testadas. Observa-se que a concentração de 1 mg.mL⁻¹ eliminou próximo a metade das células comparando-se ao controle e a

concentração de 15 mg.mL^{-1} expressou maior efeito sobre o parasita.

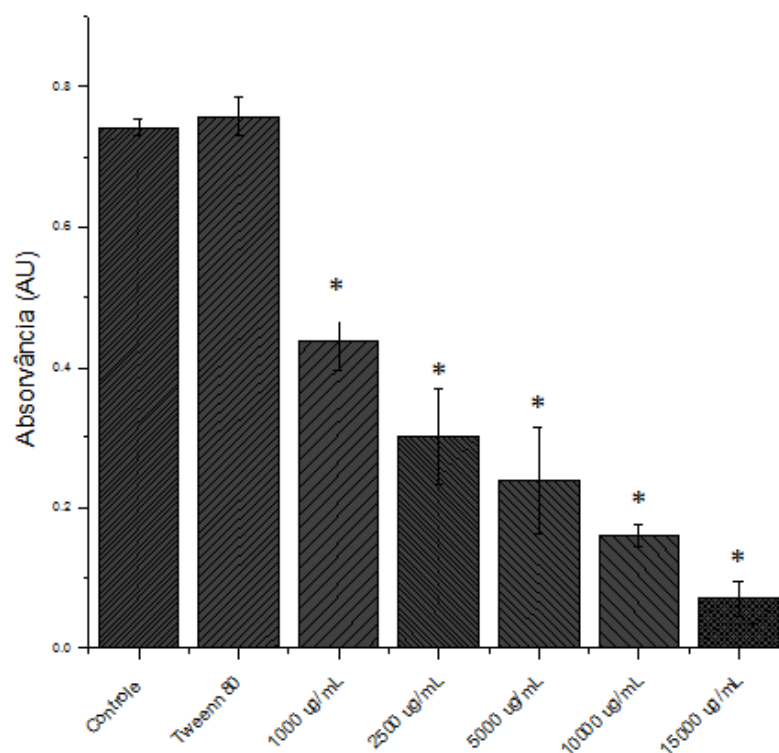


Figura 18 – Gráfico da absorbância obtida para *Leishmania infantum chagasi* em 24 horas nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} a 15 mg.mL^{-1} . Os (*) representam diferenças significativas entre os grupos quando comparados com o controle e o Tween 80 ($p < 0.05$).

A figura 19, apresenta a porcentagem de viabilidade celular da *L. infantum chagasi* quando testada com a base de Schiff Salofen nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} até 15 mg.mL^{-1} após 24 horas de incubação.

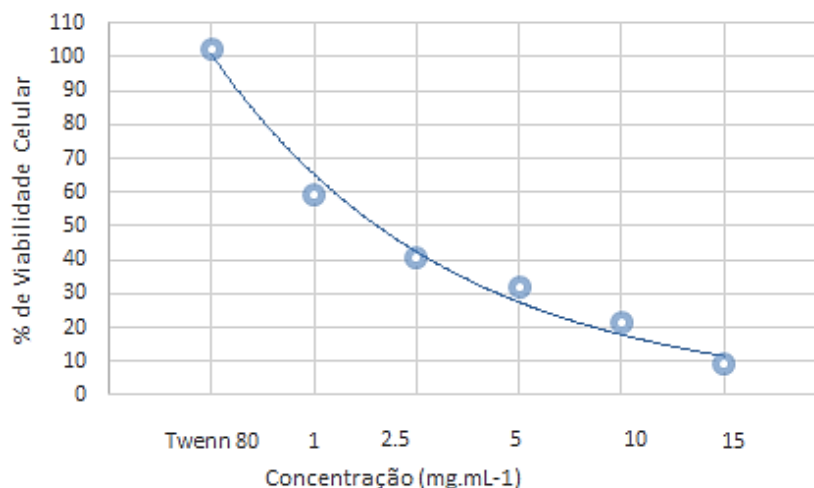


Figura 19 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra a forma promastigota de *L. infantum*, em 24 horas. Valor representativo dos experimentos realizados em triplicata.

Os resultados demonstraram que o composto inibiu quase totalmente o crescimento das promastigotas na concentração de 15 mg.mL⁻¹ (figura 11). Inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *L. infantum chagasi* nas concentrações de 2,5 a 10 mg.mL⁻¹, esta última com valores perto de 80% de morte celular. Destaca-se que a concentração de 1 mg.mL⁻¹ correspondeu aproximadamente ao IC50. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas do composto em 24 horas foi de 1.22 mg.mL⁻¹.

A figura 20, apresenta a absorvância obtida através da leitura em espectrofotômetro para *Leishmania infantum chagasi* em 48 horas.

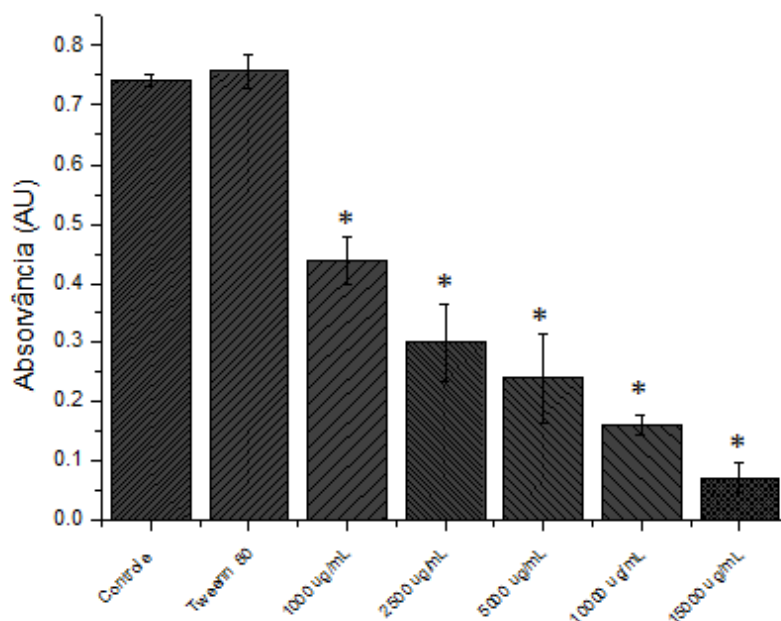


Figura 20 – Gráfico da absorbância obtida para *Leishmania infantum chagasi* em 48 horas nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} a 15 mg.mL^{-1} .

Na figura 20, podemos observar uma continuidade dos resultados das 24 horas, com a taxa de morte crescente conforme o aumento da concentração.

A figura 21 apresenta-se a porcentagem de viabilidade celular da *L. infantum chagasi* quando testada com a base de Schiff Salofen nas concentrações de 1 mg.mL^{-1} até 15 mg.mL^{-1} após 48 horas de incubação.

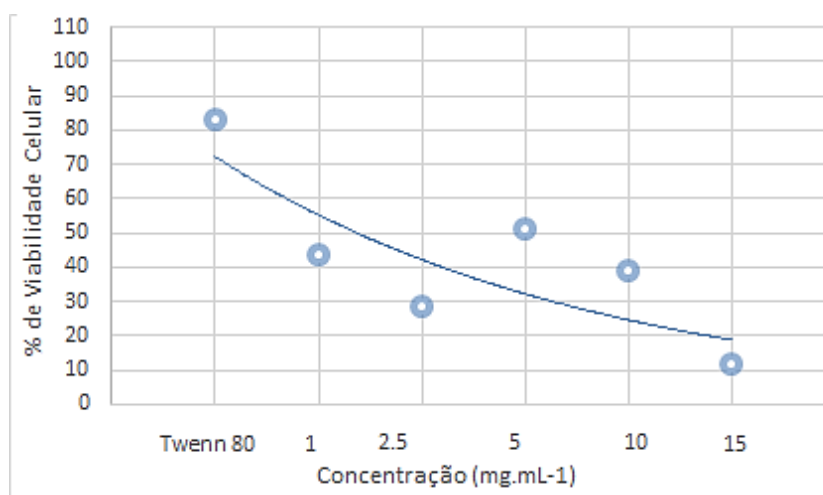


Figura 21 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra promastigota de *L. infantum*, às 48 horas. Valor representativo dos experimentos, realizados em triplicata.

Pode-se observar que após 48 horas as concentrações de 1 a 15 mg.mL^{-1} inibiram

parcialmente o crescimento do parasita. Esta última concentração afetou o cultivo com porcentagens de morte celular próximo a 90%. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas do composto em 48 horas foi de 0.89 mg.mL⁻¹.

A Figura 22 apresenta a absorbância obtida através da leitura em espectrofotômetro para *L. infantum chagasi* em 24 horas.

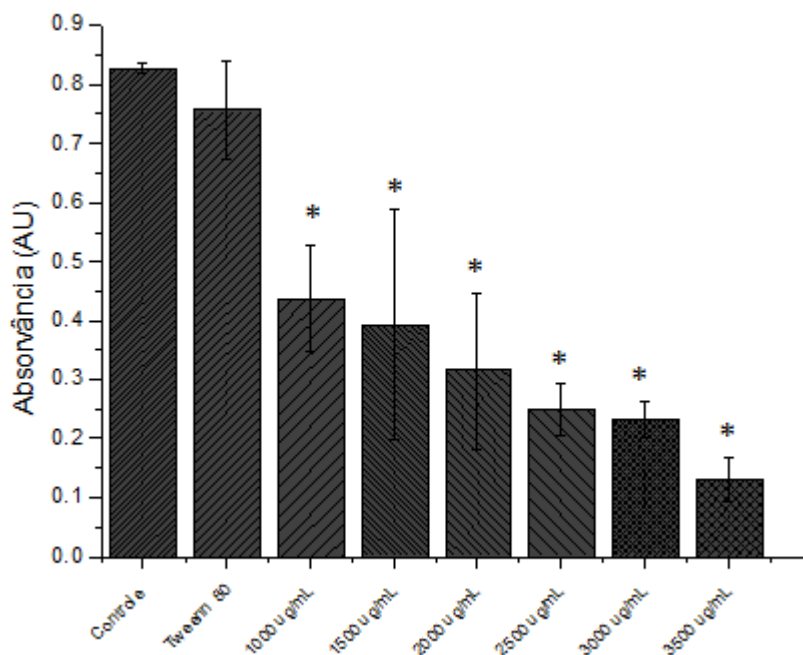


Figura 22 – Gráfico da absorbância obtida para *Leishmania infantum chagasi* em 24 horas nas concentrações de 1 mg.mL⁻¹ a 3,5 mg.mL⁻¹.

A figura 22, expressa a absorbância obtida nas concentrações de 1 mg.mL⁻¹ a 3,5 mg.mL⁻¹, onde podemos observar que a menor concentração testada eliminou aproximadamente 50% das células e a maior concentração eliminou mais de 80%.

A figura 23 apresenta a porcentagem de viabilidade celular da *L. infantum* testada com a base de Schiff Salofen nas concentrações de 1 mg.mL⁻¹ até 3,5 mg.mL⁻¹ após 24 horas de incubação

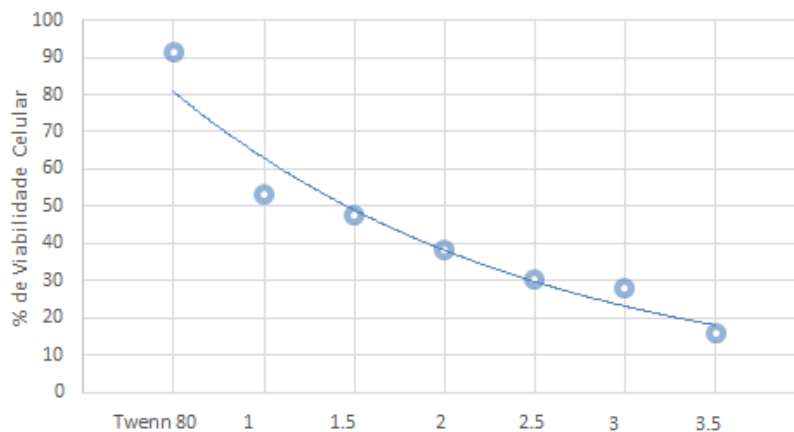


Figura 23 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra a forma promastigota de *L. infantum*, em 24 horas. Valor representativo dos experimentos, realizados em triplicata.

Podemos observar que o composto inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *L. infantum chagasi* nas concentrações de 1 a 3.5 mg.mL⁻¹, esta última com valores perto de 80% de morte celular. Destaca-se que a concentração de 1 mg.mL⁻¹ correspondeu aproximadamente ao IC50. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas do composto às 24 horas foi de 1.06 mg.mL⁻¹.

A Figura 24, apresenta a absorvância obtida através da leitura em espectrofotômetro para *L. infantum chagasi* em 48 horas

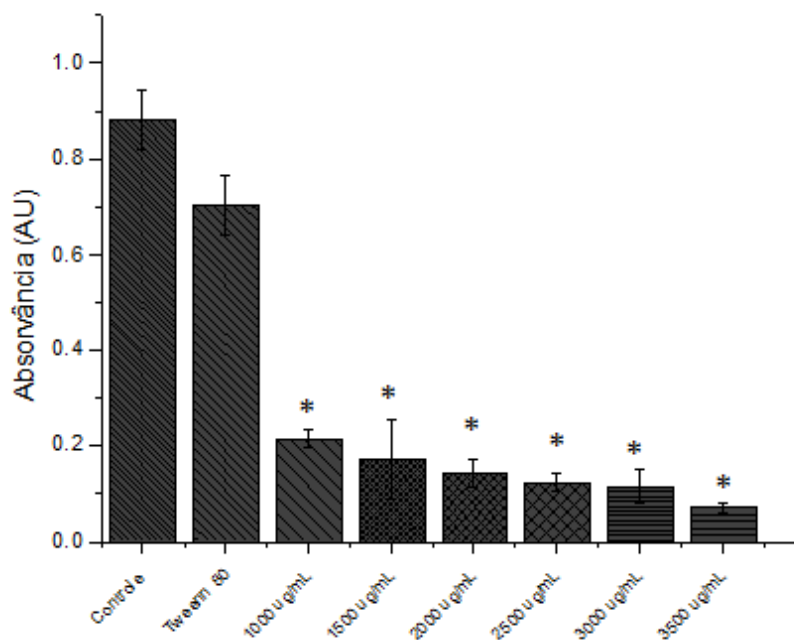


Figura 24 – Gráfico da absorvância obtida para *Leishmania infantum chagasi* em 48 horas nas concentrações de 1 mg.mL⁻¹ a 3,5 mg.mL⁻¹.

A partir da figura 24 observa-se que a menor concentração testada, em 48 horas

eliminou mais de 50% e a mais alta eliminou mais de 90%.

A figura 25 apresenta a porcentagem de viabilidade celular da *L. infantum* chagasi quando testada com a base de Schiff Salofen nas concentrações de 1mg/mL^{-1} até 3.5mg/mL^{-1} após 48 horas de incubação.

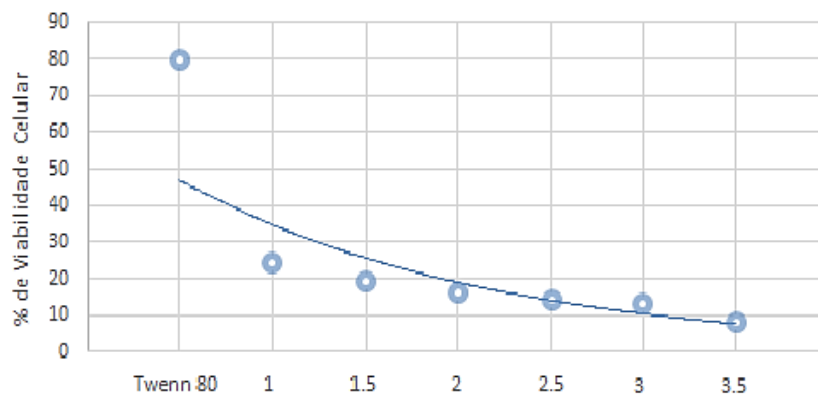


Figura 25 – Curva de viabilidade em função das concentrações da base de Schiff Salofen contra promastigota de *L. infantum*, em 48 horas. Valor representativo dos experimentos, realizados em triplicata.

Podemos observar que em 48 horas as concentrações de 1 a 3.5mg.mL^{-1} afetaram significativamente o crescimento, sendo esta última a que mais afetou o cultivo com porcentagens de morte celular perto do 90%. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas do composto em 48 horas foi de 0.66mg.mL^{-1} .

Observa-se na figura 26 a imagem microscópica demonstrando o potencial inibitório do Salofen contra *L. infantum* chagasi. A) células viáveis B) células eliminadas.

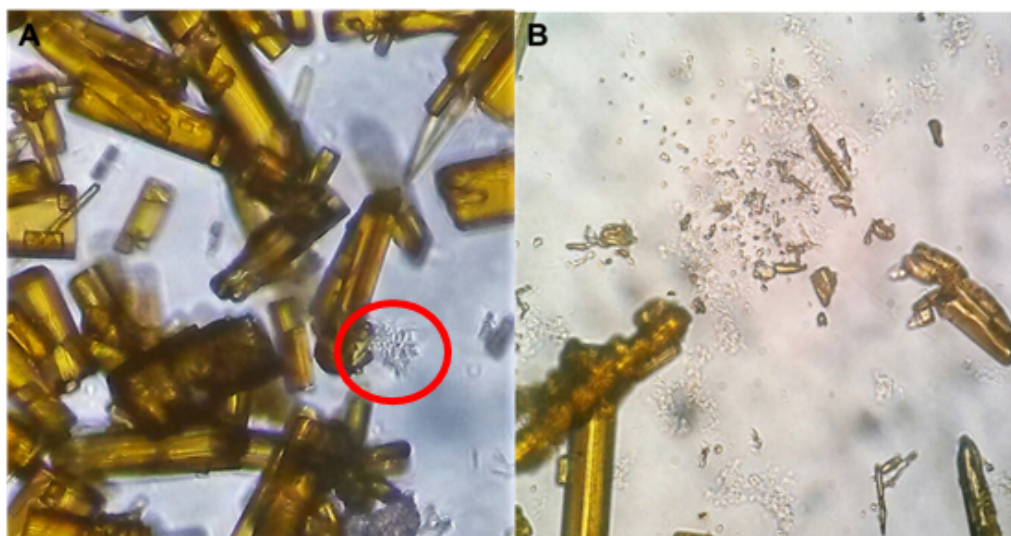


Figura 26 – Imagem microscópica (40x) da base de Schiff Salofen agindo sobre células de *Leishmania*. A) Cristais em contato com formas viáveis do parasita. B) Cristais após a eliminação do parasita em 24 horas.

6 DISCUSSÃO

Os ensaios antimicrobianos realizados através da técnica de difusão em ágar, demonstraram resultados satisfatórios para todos os microrganismos testados. Dentre os testados, o que indicou maior sensibilidade através da mensuração dos halos foi a levedura *C. albicans* e o que demonstrou menor sensibilidade foi a cepa de *Proteus* spp. AZAB; RIZK; AMR (2015), estudaram a atividade biológica de bases de Schiff sobre cepas bacterianas e *C. albicans* através da técnica de difusão. Os autores observaram que os compostos demonstraram um efeito elevado sobre os microrganismos, principalmente a 3,3-Di(4-methoxyphenyl)-5-phenyl-4,5-dihydroimidazo[4,5-c]pyrazole com halos de até 21 mm para a levedura. Os halos menores observado por estes autores, estão coerentes pois a concentração testada pelos autores foi menor ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Foi observado que em alguns experimentos de difusão utilizando-se a concentração de 35 mg.mL^{-1} apresentaram halos menores em relação a de 25 mg.mL^{-1} . Possivelmente, o caráter hidrofóbico do Salofen pode dificultar a difusão deste no meio de cultura sólido. Os halos referentes aos microrganismos *E. faecalis*, *B. subtilis*, *Salmonella* spp, *S. epidermidis* e *C. albicans*, foram crescentes de acordo com o aumento das concentrações, demonstrando que o método foi eficiente.

Um estudo conduzido por RAZOOL; HASNAIN (2015), utilizou a técnica de difusão em ágar para testar bases de Schiff poliméricas contra cepas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans*, *M. canis* e *C. neoformans*. Os resultados formados, foram expressos em milímetros como neste trabalho e a base que expressou alta atividade foi AGP-Cu (II), com halos de 22 mm para *E. coli*, 20 mm para *S. aureus*, 20 mm para *B. subtilis* e 18 mm para *C. albicans*. Estes resultados corroboram aos do presente trabalho, com medidas de halos semelhantes para os mesmos microrganismos testados.

O fato de alguns resultados não expressarem uma continuidade crescente de halos conforme o aumento das concentrações, nos levou a realizar ensaios de microdiluição, com o intuito de utilizar concentrações melhorando a solubilidade do composto e quantificação da inibição microbiana de acordo com as diluições, pois é uma técnica muito sensível e de alto rendimento (ELOFF et al., 1998; GABRIELSON et al.2002; PALOMBO, 2011).

Em relação aos ensaios de microdiluição, os resultados relacionados as bactérias Gram-negativas *Salmonella* spp e *C. freundii*, o composto testado exerceu muita influência sobre estas estirpes, até a concentração mais baixa testada de $156 \mu\text{g.mL}^{-1}$. PAHONTU e colaboradores (2015), estudaram diversas bases de Schiff e obtiveram melhores resultados para as Gram-positivas, dados opostos aos detectados neste trabalho. Os pesquisadores demonstraram para *Salmonella enteridis*, concentrações inibitórias mínimas maiores de

10 mg.mL⁻¹. No presente trabalho obtivemos inibição de quase 100% até 625 µg.mL⁻¹. ÜNVER e colaboradores (2016), testaram dez derivados de base de Schiff contra espécies de Gram-positivas, Gram-negativas e fungos e verificaram que todos os compostos apresentaram atividade antimicrobiana, porém mais ativos contra as Gram-negativas, demonstrando resultados semelhantes ao nosso trabalho.

Ainda sobre o estudo de PAHONTU e colaboradores (2015), avaliou-se o efeito das bases sobre *C. albicans* e os resultados não foram satisfatórios, apenas obtiveram resultados com as bases de Schiff complexadas com metais. Estes dados estão de acordo com o nosso trabalho, pois nos testes de microdiluições, não foram obtidos resultados satisfatórios. De forma geral, as dosagens dos antifúngicos são altas, chegando até 3600 mg/kg (CASTRO et al, 2006). Isto pode explicar, provavelmente, os resultados dos testes de difusão apresentarem resultados tão satisfatórios para este microrganismo e os resultados dos ensaios de microdiluição não serem promissores.

Ao observar os ensaios de microdiluição para as bactérias Gram-positivas, notou-se uma boa ação do composto frente as bactérias testadas, com os melhores resultados para *S. aureus* e *B. subtilis*. NAYAB et al (2015), estudaram três bases de Schiff derivadas de naftalimida, sendo 2-Amino-benzo[de]isoquinolin-1,3-dione (3a), 2-[(2-Hydroxy-3-methoxy) benzyldene)amino]benzo[de] isoquinolin-1,3-dione, (3b) e 2-[(4-Hydroxy-3-ethoxy)-benzyldene)amino]benzo[de] isoquinolin-1,3-dione contra (3c) contra cepas patogênicas, inclusive Gram-positivas através da técnica de microdiluição. Estes autores concluíram que a mais eficiente foi a 3c para todos os microrganismos, apresentando MIC de 0.062mg.mL⁻¹ para *S. aureus*. As outras duas estudadas apresentaram MIC >1000 µg.mL⁻¹. A base de Schiff Salofen, estudada neste trabalho inibiu mais de 90% até 156 µg.mL⁻¹, demonstrando assim uma maior eficiência ao comparar com a 3a e 3b e menos eficiência comparando a 3c.

A importância do estudo de compostos com atividade leishmanicida se deve ao fato da toxicidade dos medicamentos atualmente utilizados. A leishmaniose visceral é uma doença endêmica e existem alguns tratamentos, como por exemplo a anfotericina B e antimoniato pentavalente, porém nem sempre são eficientes e existem efeitos colaterais graves. Outro ponto negativo é o fato da leishmaniose ser uma doença negligenciada e por isso não há tanto interesse de indústrias farmacêuticas em investir em pesquisa e desenvolvimento, mesmo havendo uma grande necessidade de descobertas de novos fármacos (WHO, 2010).

Os parasitas do gênero *Leishmania*, possuem um comportamento semelhante às células tumorais em relação à sensibilidade a fármacos e a multiplicação celular e as bases de Schiff já demonstraram um potencial interessante contra células cancerígenas (VILLAR et al, 2004) e antimalária (LI et al, 2003). Existem poucos estudos que testaram a atividade das bases de Schiff sobre a *Leishmania* (BOZZA, 2014; COELHO, 2015),

entretanto demonstraram resultados leishmanicidas promissores.

O estudo de COELHO (2015), testou 15 derivados de base de Schiff complexadas com metais e o ligante livre e o composto E1 exibiu melhor atividade com o IC50 em 25,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os ligantes complexados exibiram melhor atividade ao comparar com o ligante livre. Outro estudo feito por SHUJAH et al (2013), foi descrito por apresentar bons resultados quando complexados com estanho. Estes resultados demonstraram que o efeito dos derivados de bases de Schiff possuem melhor efeito leishmanicida quando complexados com metais, como Zinco, Ferro e Cobre, o que nos dá uma perspectiva futura de testes com complexação de metais ao Salofen.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi testada a base de Schiff N,N'-bis(salicilideno)-1,2-fenilenodiamina contra 10 cepas bacterianas e 1 fungo leveduriforme através da técnica de difusão em ágar com três concentrações de 25 mg.mL⁻¹, 35 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹ e todas apresentaram halos de inibição, sendo a *C. albicans* o halo mais representativo em todas as concentrações (30 mm).

Através dos ensaios de microdiluição, testaram-se 5 concentrações, 2500 µg.mL⁻¹, 1250 µg.mL⁻¹, 625 µg.mL⁻¹, 325 µg.mL⁻¹ e 156 µg.mL⁻¹ da base de Schiff contra 6 patógenos e houve inibição do crescimento em todas as concentrações testadas, sendo mais expressiva contra as Gram-negativas.

Obteve-se o IC50 do composto sobre a *Leishmania* em 24 e 48 horas que foi de 1,06 mg.mL⁻¹ e 0,66 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Assim, os dados sugerem que este composto possui atividade antibacteriana e leishmanicida.

Estão sendo testados o efeito desinfetante da base de Schiff Salofen em superfície abiótica contra *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*, visando uma futura aplicação biotecnológica.

Há raros relatos na literatura abordando a utilização desse composto e esta é a primeira vez em que são estudadas as atividades antimicrobiana e leishmanicida ao mesmo tempo.

Após a análise destes dados, alguns estudos futuros são de grande importância, como testar o efeito sinérgico ou antagônico do composto associado a antibióticos comerciais sobre os microrganismos; avaliar o tempo de morte comparado a antibióticos conhecidos, testar a citotoxicidade em células de mamíferos como por exemplo fibroblasto e macrófagos e possivelmente avaliar este ligante com metais complexados.

8 Referências Bibliográficas

AFRICA, C. W. J.; ABRANTES, P. M. S. Candida Antifungal Drug Resistance in Sub-Saharan African Populations: A Systematic Review. *F1000 Research*, v.1, p. 1-7, 2017.

AMIM, R. et al. Antibacterial Effect of Some Benzopyrone Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n.45, p. 372-378, 2010.

ANNANG, F. et al. High-throughput Screening Platform for Natural Product-Based Drug Discovery Against 3 Neglected Tropical Diseases: Human African Trypanosomiasis, Leishmaniasis, and Chagasi Disease. *Journal of Biomolecular Screening*, v.20, p. 82-91, 2015.

ARGAW, N. A. et al. Assessment of surgical antimicrobial prophylaxis in orthopaedics and traumatology surgical unit of a tertiary care teaching hospital in Addis Ababa. *MC Res. Notes*. v.20, 2017.

AZAB, M. E.; RIZK, S. A. AMR, A. M. G. Synthesis of Some Novel Heterocyclic and Schiff Base Derivatives as Antimicrobial Agents. *Molecules*, v.20, P. 18201-18218, 2015.

AZIS, A. et al. Synthesis, Structural Characterization, Thermal Studies, Catalytic Efficiency and Antimicrobial Activity of Some M(II) Complexes with ONO Tridentate Schiff base N-salicylidene-O-aminophenol (saphH2). *Journal of Molecular Structure*, v.1010, p. 130-138, 2012.

BAIDEN, F. et al. The Need for New Antibiotics. *The Lancet*, n.375, p. 637-638, 2010.

BANETH, G. et al. Canine Leishmaniosis - New Concepts and Insights on an Expanding Zoonosis: Part One. *Trends in Parasitology*, n.7, v.24, p. 324-330, 2008.

BARATA, R. et al. Aspectos da Ecologia e do Comportamento de Flebotomíneos em Área Endêmica de Leishmaniose Visceral, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n.5, v.38, p. 421-425, 2005.

BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for Human Disease: An Update on Plant-Derived Compounds Antibacterial Activity. *Microbiological Research*, n.196, p. 44-68, 2017.

BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. New Treatment options against gram-negative organisms. *Critical Care*, v.215, n.15, 2011.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania Metacyclic Promastigotes by Phlebo-

tomine Sand Flies. *International Journal for Parasitology*, n.10, v.37, p. 1097-1106, 2007.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. Infectious Diseases: A Global Challenge. *International Journal of Medical Microbiology*, v.296, n.4-5, p. 179-185, 2006.

BENAIM, G. et al. Dronedarone, an amiodarone analog with improved antiLeishmania mexicana efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.25, p. 2295-2303, 2014.

BENAIM, G. et al. Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.430, p. 1091-1096, 2013.

BHAT, K. et al. Synthesis and characterization of various Schiff bases for non-linear optical applications. *Mater. Chem. Phys.*, 1996, 44, 261-266.

BHATT, D., et al. Nanotechnology Solutions to Combats Superbugs. *Nanowerk*, 2013.

BONATO, B. S. et al. Oculares de Microscópios Podem ser Veículos de Contaminação? *News Lab*, v.81, p. 98-104, 2007.

BOUCHER, H. W., et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! Na Update from the infectious Diseases Society of America. *IDSA REPORT*, 2009.

BOZZA, G. F. Síntese e caracterização de complexos de Paládio(II) contendo ligantes imínicos. Aspectos estruturais e potencialidades leishmanicidas. *Dissertação (Mestrado)*, Universidade Federal de Alfenas, concentração: Química Inorgânica, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº44, de 26 de Outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. Acesso em 29 de março de 2017.

BRASIL. *Leishmania Visceral: Recomendações Clínicas para Redução da Letalidade*, 2011.

BRINGMANN, G. et al. Ancistrotanzanine C and related 5,1' and 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tanzaniensis*. *Journal of Natural Products*, n.67, p. 743-748, 2004.

CASTRO, T. L. et al. Mecanismos de Resistência da *Candida sp* WWA Antifúngicos. *Infarma*, n.9, v.18, 2006.

CHEN, T. C. et al. Fluconazole Exposure Rather Than Clonal Spreading is Correlated with the Emergence of *Candida glabrata* with Crossresistance to Triazole Antifungal Agents. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, n.6, v.28, p. 306-315, 2012.

CHEN, Y. et al. In vitro Activity of Nemonoxacin (TG-873870), a Novel Non-

fluorinated Quinolone, Against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*, enterococci and *Streptococcus pneumoniae* With Various Resistance Phenotypes in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.64, p. 1226-1229, 2009.

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.

COELHO, L. G. G. Bases de Schiff como potenciais agentes leishmanicidas contra *Leishmania chagasi* in vitro. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos, 2015.

DAGNINO, A. P. et al. Leishmanicidal Activity of Lipophilic Extracts of Some *Hypericum* Species. *Phytomedicine*, v.22, p. 71-76, 2015.

DHAR, D. N.; TAPLOO, C. L. Schiff bases and their applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 1982.

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.

ELOFF, J. N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. *Planta Medica*, n.8, v.64, p. 711-713, 1998.

ESTEVEZ-SOUZA, A. et al. Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina. *Química Nova*, v.27, n.1, p. 72-75, 2004.

FARREL, N. Recent Developments in the chemistry of 1,3,2-diazaborolines-(2,3-dihydro-1H-1,3,2-diazaboroles). *Coordination Chemistry Reviews*, v.232, p. 1-31, 2007.

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

FERNANDES, P. Antibacterial Discovery and Development – the Failure of Success? *Nature Biotechnology*, n.24, p. 1497-1503, 2006.

FINCH, R. Innovation – Drugs and Diagnostics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n.60, p. 79-82, 2007.

FLECK, R.; HOF, H. Breakpoints for *Pozaconazole* Susceptibility Testing: Background and Discussion About the Need of Establishing Values. *Mycoses*, v.51, p. 1-4, 2008.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, v. 50, p. 63-73, 2002.

GAITE, F. B. et al. Nuevas Opciones Terapêuticas para el Tratamiento de las Bactérias Multirresistentes en Unidades de Cuidados Intensivos. *Revista Española de Quimioterapia*, p. 9-13, 2008.

GUALCO, L. et al. Antifungal Resistance in *Candida* spp Isolated in Italy Between 2002 and 2005 for Children and Adults. *International Journal of Antimicrobial Agents*, n.29, p. 179-184, 2007.

GUO, Z. et al. Antifungal Properties os Schiff Bases of Chitosan, N –sunstituted Chitosan and Quaternized Chitosan. *Carbohydrate Research*, n.342, p. 1329-1332, 2007.

HAMBRAEUS, A. Lowbury Lecture 2005: Infection Control from a Global Perspective. *Journal of Hospital Infection*, v.64, n.3, p. 217-223, 2006.

HEARN, M. J.; CYNAMON, M. H. Design and Synthesis of Antituberculars: Preparation na Devaluation Against *Mycobacterium tuberculosis* of an Isoniazid Schiff Base. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, n.2, v.53, p. 185-191, 2004.

HISAINDEE, S. et al. Antipathogenic Effects of Structurally-Related Schiff Base Derivatives: Structure–Activity Relationship. *Arabian Journal of Chemistry*, v.8, p. 828-836, 2015.

HOLM, R. H.; EVERETT Jr, G. W.; CHAKRAVORTY, A. Metal Complexes os Schiff Bases and β -Ketoamines. *Progress in Inorganic Chemistry*, v.7, p. 83-214, 1966.

HOLT, G. J. et al. *Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Ed: Willians & Wilkins, v.2, 1994.

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

HUTTNER, A., et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated infections Forum. *Antimicrobial Resistance and Infection contro*, v.32, n.2, 2013.

JARRAHPOUR, A. et al. Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity Evaluation of Some New bis-Schiff Bases of Isatin and Their Derivatives. *Molecules*, n.8, v.12, p. 1720-1730, 2007.

KATZ, M. L. et al. Were Have all the antibiotic patentes gone? *Nature Biotechnology*, n.24, p. 1529-1531, 2006.

KEYPOUR, H. et al. *Coordenation Chemistry Reviews*, v.65, p. 1004-1016, 2012.

KEYPOUR, H. et al. Synthesis and characterization of a series of transition metal complexes with a new symmetrical polyoxaaza macrocyclic Schiff baseligand: X-raycrystalstructure of cobalt(II) and nickel(II) complexes and their antibacterial properties. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.101, p. 59-66, 2013.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, Classification and Geographical Distribution the Leishmaniasis in Biology and Medicine. *Biology and Epidemiology*, v.1, p. 1-120, 1987.

LAMBERT, P. A. Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites. *Advanced drug Delivery Reviews*, n.57, p. 1471-1485, 2005.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General Principles of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, v.86, n.2, p. 156-167, 2011.

LI, X. et al. Synthesis, Thermodynamic Properties and BSA Interactions of a New Valen Schiff Base Derived From o-vanillin and Trimethopim. *Thermochimica Acta*, v.575, n. 10, p. 291-299, 2014.

LI, Y. et al Artemisinin Derivatives Bearing Mannich Base Group: Synthesis and Antimalarial Activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, V.11, P. 4363-4368, 2003.

LOZANO, R. et al. Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, n.380, v.9859, p. 2095-2128, 2012.

LUJÁN, D. A., et al. Resistência a Antibióticos de Cepas Escherichia coli Isoladas de Infecções do Trato Urinário Adquiridas na Comunidade – Cidade de Lima, Peru. *Cient. Ciênc. Biol. Saúde*. V.20, n.17, 2012.

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.

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.

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.

MCMURRY, J. *Química Orgânica*. 6ed. São Paulo; Editora Thomsom. 2006.

MIMS, C. et al. *Microbiologia Médica*. 2ed., Ed. Manole Ltda, p. 580, 2002.

MS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral* – Ministério da Saúde, Brasil, 2006.

MURRAY, C. J. et al. Disability – Adjusted Life Years (DALYs) for 291 Diseases and Injuries in 21 Regions, 1999-2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, n.380, v.9859, p. 2197-2223, 2012.

NAIR, M. S.; ARISH, D.; JOSEYPHUS, R. S. Synthesis, Characterization, Anti-fungal, Antibacterial and DNA Cleavage Studies of Some Heterocyclic Schiff Base Metal Complexes. *Journal of Saudi Chemical Society*, n.16, p. 83-88, 2012.

NAYAB, P. S. et al. Evaluation of DNA Binding, Radicals Scavenging and Antimicrobial Studies of Newly Synthesized N-Substituted Naphthalimides: Spectroscopic and Molecular Docking Investigations. *Journal of Fluorescence*, v.25, p. 1905-1920, 2015.

NCCL. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Ed.15, v.20, n.2, p. 33, 2000.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. *Molecules That Changed the World*. Wiley-VCH: Weinheim, cap. 13, 2008.

NUNAN, E. A. et al. Estudo da Atividade Antimicrobiana de Extrato de Folha de *Aristolochia Gigantea*. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, v.6, p. 33-40, 1985.

OLIVEIRA, J. M. et al. Mortalidade por Leishmaniose Visceral: Aspectos Clínicos e laboratoriais. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina tropical*, n.2, v.43, p. 188-193, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPS-OMS. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses Nº3, Julho de 2015.

OUTTERSON, K. The Legal Ecology of Resistance: The Role of Antibiotic Resistance in Pharmaceutical Innovation. *Cardozo Law Review*, n.31, p. 613-678, 2009.

PAHONTU, E. et al. Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Antimicrobial Activity of Copper(II) Complexes with the Schiff Base Derived from 2-Hydroxy-4-Methoxybenzaldehyde. *Molecules*, v.20, p. 5771-5792, 2015.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2011, p. 1-15, 2011.

PANDEYA, S. N. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of Schiff and Mannich Bases of Isatin and its Derivatives with Pyrimidine. *IL Farmaco*, n.9, v.54, p. 624-628, 1999.

PATRICK, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press: New York, cap. 16, 2005.

PAULO, L. B. Complexos de Cobre (II) com Base de Schiff Tridentadas, tipo ONN e Tetrudentadas Simétricas e Assimétricas, tipo ONNO: Síntese e Caracterização e Estudos como Catalizadores na Oxidação de Catecóis. 2011. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. *Clinical Spectrum of Leishmaniasis*. Clinical

Infectious Diseases, n.1, v.22, p. 1-13, 1996.

PESSOA, I. C. Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista-RR. Dissertação (mestrado); Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RR, UFRR, p.101, 2011.

PIZA, A.; HOKKA, C.; SOUSA, C. Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. *Journal of Scientific Research and Reports*, v.4, p. 281-291, 2015.

QUINN, P. et al. *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*. 2ed. Wiley-Blackwell Scienc, p.1231, 2011.

RATTI, R. P. et al. Endophytic *Streptomyces tubercidicus* isolated from *Solanum lycocarpum* St Hill: a sheriff secondary metabolites producer. In: A. Mendez-Vilas; World Scientific Publishing Co. (Org.). *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*, v.1, p. 536-540, 2012.

RATTI, R. P., SOUSA, C. P. Meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and nosocomial infections. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v.30, p. 9-15, 2009.

RAZOOOL, R.; HASNAIN, S. Biologically active and thermally stable polymeric Schiff base and its metal polychelates: Their synthesis and spectral aspects. *Spectrochimica ACTA*, v.148, p. 435-443, 2015.

RIOS, J. L. et al. Screening Methods for Natural Products With Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v.23, p. 127-149, 1988.

ROMANO, L. H. et al. Marine *Streptomyces acrimycini* and *S. cebimarensis* can produce cytotoxic activity on cells HCT-8 and SF295. *Toxicon (Oxford)*, v. 91, p. 182-185, 2014.

RONAD, P. M. et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of 7-(2-substituted phenylthiazolidinyl)-benzopyran-2-one Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, n.45, p. 85-89, 2010.

SARAIVA, A. M., et al. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Campinas, v. 15, 2013.

SECUNDINO, N. F. C. et al. *Lutzomyia Longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. *Journal of Medical Entomology*, n.6, v.42, p. 928-938, 2005.

SHLAES, D. Fix the Antibiotics Pipeline. *Nature*, n.32, v.472, 2011.

SHRINER, R. L. et al. *The Systematic Identification of Organic Compounds*. Jhon Wiley & Sons, New York, 2004.

SHUJAH, S. et al. Bioactive hepta - and penta - coordinated supramolecular diorganotin (IV) Schiff bases. *Journal of Organometallic Chemistry*, v.741-742, p. 59-66, 2013.

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

SILVA, C. M. et al. Schiff Bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, n.2, p.1-8, 2011.

SILVA, P. *Drogas Antifúngicas*. In *Farmacologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5^aed., p. 1081-1090, 2005.

SILVA, V. et al. Red de Diagnóstico en Micología Médica. Vigilancia de la Resistencia de Leveduras a Antifúngicos. *Revista Chilena de Infectología*, v.19, 2002.

SOUSA C. P. Vigilância à Saúde e Prevenção na Transmissão de Patógenos. *Revista Cultura e Extensão USP*, v.11, p. 60, 2014.

SOUZA, A. O. et al. Antimycobacterial and Cytotoxicity Activity of Synthetic and Natural Compounds. *Quimica Nova*, n.7, v.30, p. 1563-1566, 2007.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods Against Human Leishmaniasis infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.7, 2013.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, n.2, v.16, p. 237-252, 2015.

TAKALA-HARRISON, S. et al. Independent Emergence of Artemisinin Resistance Mutations Among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *The Journal Infectious Diseases*, n.5, v.211, p. 670-679, 2015.

TASNEEM, T. et al. An Expeditious Green Synthesis of Schiff Bases and Aze-tidinones Derivatized with 1,2,4-triazoles. *Journal of Chemical Sciences*, n.5, v.123, p. 657-666, 2011.

TIDWELL, T. T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of β -Lactam Synthesis. *Angewandte Chemie*, v.47, p. 1016-1020, 2008.

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.

TOLEDO, T. A. et al. Thermal and Biological Properties of the Schiff Base N,N'-bis(Salicylidene)-1,2-phenylenediamine, a potential adjuvante to antibiotic therapy. *Jour-*

nal of Molecular Structure, n.1115, p. 105-108, 2016.

TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 3ed, São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

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

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK A. J. Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents for Righer Plants. *Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity*. London: Academic Press, p.47-69, 1991.

VIGIATO, P. A.; TAMBURINI, S. The Challenge of Acyclic and Schiff Bases and related derivatives. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 248, p. 1717-2128, 2004.

VILLAR, R. et al. Synthesis and cytotoxic activity of lipophilic sulphanamide derivatives of the benzo[b]thiophene1,1dioxode, *Bioorganic and Medicinal Chemisitry*, v.12 p. 963-968, 2004.

WALSH, C. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistence*. ASM Press: Washington, 2003.

WISE, R.; PIDDOCK, R. The Need for New Antibiotics. *The Lancet*, n.375, p. 638, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis*. Internet, accessed 04/04/2017. WRIGHT, G. An Irresistible Newcomer, *Nature*, n.442, v.517, 2015.

WRIGHT, G. D. Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n.57, p. 1451-1470, 2005.