

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

Laiza Gabriela Gavioli Coelho

**Bases de Schiff como potenciais agentes leishmanicidas
contra *Leishmania chagasi* in vitro**

São Carlos

2015

Laiza Gabriela Gavioli Coelho

**Bases de Schiff como potenciais agentes leishmanicidas
contra *Leishmania chagasi* in vitro**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores: Profa Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C672b Coelho, Laiza Gabriela Gavioli
Bases de Schiff como potenciais agentes
leishmanicidas contra *Leishmania chagasi* in vitro /
Laiza Gabriela Gavioli Coelho. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
98 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

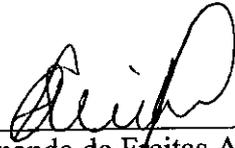
1. Leishmaniose visceral. 2. Metal pesado. 3.
Promastigotas. 4. Resazurina. I. Título.

Laiza Gabriela Gavioli Coelho

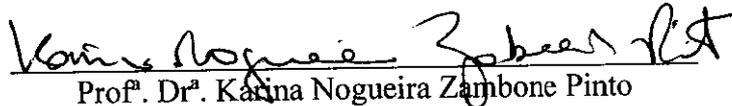
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 28/09/2015

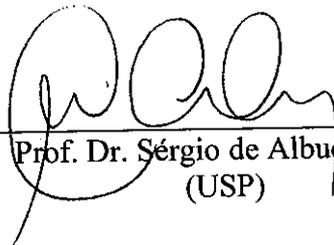
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dr. Fernanda de Freitas Anibal - Orientadora
(PPG-Biotec/UFSCar)



Prof. Dr. Katina Nogueira Zambone Pinto
(UFSCar)



Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque
(USP)

AGRADECIMENTOS

À MINHA FAMÍLIA, EM ESPECIAL MINHA MÃE E MEU PAI E AOS MEUS TRÊS AMORES, KIM, SOFI E SARA, TAMBÉM AO MEU IRMÃO E CUNHADA. AGRADEÇO A DEUS.

AOS MEUS ORIENTADORES, FERNANDA E CLÓVIS, PELA PACIÊNCIA, ENSINAMENTOS E APOIO. E A PROFESSORA IZALTINA POR LER AS CENTENAS DE E-MAILS ENVIADOS CHEIOS DE DÚVIDAS E RESPONDE-LOS COM TANTA PACIÊNCIA E ATENÇÃO.

AO PROFESSOR DR. NELSON LUIS DOMINGUES E A TODA SUA EQUIPE PELA DOAÇÃO DOS COMPOSTOS PARA TODO O EXPERIMENTO. AGRADEÇO AO LABORATÓRIO DO PROF. DR. SÉRGIO ALBUQUERQUE PELA DOAÇÃO DAS CEPAS DE LEISHMANIA.

AOS FUNCIONÁRIOS DO DMP: CIDINHA, BETO, PAULO, ZÉLIA.

COM TODO O MEU CARINHO E SAUDADE A MINHA FAMÍLIA DA UNESP, A QUAL GANHEI EM MINHA GRADUAÇÃO E QUE APESAR DA DISTÂNCIA E TURBULÊNCIAS DO DIA-À-DIA CONTINUARAM PRESENTES: MARILIA, LAÍS, SIMONÝ E TÁLIA. E CLARO A CADA INTEGRANTE DA MINHA QUERIDA TNT.

À TODOS COM QUEM MOREI EM SÃO CARLOS NESSA FASE DA MINHA VIDA. EM ESPECIAL A FER, ANA, MAYNARA, AMANDA, CÁ, IN E A CAROL, NÃO SÓ POR DIVIDIR A CASA, MAS TAMBÉM POR DIVIDIR MOMENTOS E CONVERSAS DIVERTIDAS.

AOS MEUS AMIGOS DE LABORATÓRIO, POR TODA A AJUDA, RISADA E DESCONTRAÇÃO, DÉBORA, JOICE, ELIZANDRA, GI, LU CAMILO, RICARDO, KARINA, CAROL. EM ESPECIAL A LU PAGIATTO PELA PACIÊNCIA EM AJUDAR A OLHAR AS CULTURAS, ALÉM DISSO, AGRADEÇO A ELA E A CAMILA PELO COMPANHEIRISMO NA DIVERSÃO. AGRADEÇO AOS RAPAZES: JONAS, ANTÔNIO, MAURÍCIO, LEONI, RAFAEL, PEDRO E EM ESPECIAL AO TÚLIO, PELO MATERIAL DOADO EM TODA PRIMEIRA PARTE DO EXPERIMENTO.

À CAPES PELO APOIO FINANCEIRO E AO PROGRAMA DE BIOTECNOLOGIA DA UFSCAR PELA OPORTUNIDADE.

RESUMO

As Doenças Negligenciadas são um grupo de doenças com maior incidência em regiões pobres e de clima tropical ou subtropical, para quais existem pouco investimento das indústrias farmacêuticas na busca por novos fármacos. As Leishmanioses estão listadas nesse grupo de doenças, podendo se apresentar de duas formas: Leishmaniose Tegumentar ou Leishmaniose Visceral (LV). A LV no novo mundo tem como etiologia a *Leishmania chagasi*, sendo esta transmitida pela picada do Flebotomíneo, principalmente a *Lutzomyia longipalpis*, no Brasil. Alguns medicamentos são utilizados para o tratamento da LV. Contudo, ainda há taxas de recidiva e de letalidade altas. Além disso, apresentam efeitos colaterais severos relacionados a essas terapias, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade. Dessa forma, nesse trabalho tivemos como objetivo avaliar a atividade de 15 compostos de bases de Schiff complexados ou não a metais (cobre, níquel, zinco e ferro) em inibir promastigotas de *Leishmania chagasi in vitro*. E ainda, determinar a citotoxicidade destes compostos em macrófagos e fibroblastos, *in vitro*. Para os ensaios com as promastigotas foi realizado incubação de 24 horas e para avaliação da viabilidade foi utilizado o método da resazurina. Para avaliação da citotoxicidade dos compostos contra macrófagos e fibroblastos, a incubação foi durante 24 ou 48 horas, utilizando o método colorimétrico MTT. Nossos resultados demonstraram que dos 15 compostos avaliados, 11 apresentaram boa atividade em inibir as promastigotas nas concentrações testadas, sendo a citotoxicidade realizadas apenas com estes 11 compostos. Os complexos com cobre (D1, D2, D3) apresentaram melhores atividades quando comparados com seus respectivos ligantes livres. Todavia, estes também apresentaram citotoxicidade contra células avaliadas. Entretanto, os compostos complexados com ferro (C1 e C3) também apresentaram atividade contra as promastigotas, no entanto, apresentaram baixa citotoxicidade frente as células, exceto o C1 que apresentou toxicidade discreta frente a macrófagos. O grupo methoxy foi o que apresentou melhor atividade quando comparado com os outros ligantes livres. Assim, nossos dados sugerem que esses compostos complexados com Fe, principalmente o composto C3, podem ser promissores na busca por compostos para o tratamento da Leishmaniose Visceral. Estudos futuros *in vitro*, com formas amastigotas, e em animais poderão comprovar sua eficácia em ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Metal pesado, Promastigotas, Resazurina.

ABSTRACT

The neglected diseases are a group of diseases with a higher incidence in poor regions and tropical or subtropical climate. The leishmanioses are listed in this group of diseases, which may present themselves in two ways: tegumentary leishmaniasis or Visceral Leishmaniasis (VL). The VL in the new world has as the etiology *Leishmania chagasi*, which is transmitted by the bite of the sandfly, especially *Lutzomyia longipalpis*. There are some medications used for the treatment of VL, however, still there are recurrence rates and high mortality. In addition to the severe side effects related to these therapies, as Nephrotoxicity, hepatotoxicity and cardiotoxicity. Not long ago it was developed the amphotericin B encapsulated the Liposomes, associated with mild side effects, however still with an onerous cost, being hard to use in regions devoid of resources. In this work we aim to evaluate the activity of 15 compounds with Schiff bases complexed or not the metals (copper, nickel, zinc and iron), to inhibit promastigotes of *Leishmania chagasi in vitro*, as well as the cytotoxicity of these front of macrophages and fibroblasts in vitro. For tests with the promastigotas 24 hour incubation was carried out to evaluate the feasibility of resazurin method was used. To evaluate the cytotoxicity of compounds was incubated for 24 or 48 hours, using the colorimetric method with MTT. Of the 15 compounds evaluated, 11 showed good activity in inhibiting the promastigotas in the concentrations tested, the cytotoxicity performed with these 11 compounds. Copper complexes (D1, D2, D3) presented best activities when compared with their respective free ligands. However, they also showed cytotoxicity. The compounds complexed with iron (C1 and C3) also showed activity against the promastigotes, showing no or low cytotoxicity front cells, except the C1 that presented certain toxicity front of macrophages. The Methoxy group was what showed best activity when compared to the other free ligands. Generally the free ligands, without metals, were the ones who presented lower cytotoxicity.

Key words: Visceral Leishmaniasis, Heavy Metal, Leishmanicida, Promastigotas, Resazurin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição de casos notificados no Brasil em 2006.....	09
Figura 2- Forma promastigota do parasito.....	11
Figura 3 Forma amastigota do parasito.....	11
Figura 4- <i>Lutzomyia longipalpis</i>	11
Figura 5-Ciclo biológico da Leishmania.....	14
Figura 6- Paciente com LV visceral apresentando hepato e esplenomegalia.....	15
Figura 7- Lesões em região periocular e focinho de cães.....	15
Figura 8- Cão com LV apresentando caquexia	15
Figura 9- Cultura de promastigota	24
Figura 10- Cultura de fibroblastos.....	27
Figura 11 Cultura de macrófagos.....	27
Figura 12- Atividade do composto A1.....	29
Figura 13- Curva dose-resposta do composto A1.....	29
Figura 14 –Atividade do composto A2.....	31
Figura 15- Curva dose-resposta do composto A2.....	31
Figura 16- Atividade do composto A3.....	32
Figura 17- Atividade do composto B1.....	34
Figura 18- Curva dose-resposta do composto B1.....	34
Figura 19- Atividade do composto B2.....	36
Figura 20- Curva dose-resposta do composto B2.....	36
Figura 21- Atividade do composto B3.....	38
Figura 22- Curva dose-resposta do composto B3.....	38
Figura 23- Atividade do composto C1.....	40
Figura 24- Curva dose-resposta do composto C1.....	40
Figura 25-Atividade do composto C2.....	42
Figura 26- Curva dose-resposta do composto C2.....	42
Figura 27- Atividade do composto C3.....	44
Figura 28- Curva dose-resposta do composto C3.....	44
Figura 29- Atividade do composto D1.....	46
Figura 30- Curva dose-resposta do composto D1.....	46

Figura 31- Atividade do composto D2.....	48
Figura 32- Curva dose-resposta do composto D2.....	48
Figura 33- Atividade do composto D3.....	50
Figura 34- Curva dose-resposta do composto D3.....	50
Figura 35- Atividade do composto E1.....	52
Figura 36- Curva dose-resposta do composto E1.....	52
Figura 37- Atividade do composto E2.....	54
Figura 38- Curva dose-resposta do composto E2.....	54
Figura 39- Atividade do composto E3.....	56
Figura 40- Curva dose-resposta do composto E3.....	56
Figura 41- Citotoxicidade do composto A1 (macrófagos).....	58
Figura 42 Citotoxicidade do composto A2 (macrófagos).....	59
Figura 43- Citotoxicidade do composto B3 (macrófagos).....	60
Figura 44- Citotoxicidade do composto C1 (macrófagos).....	61
Figura 45- Citotoxicidade do composto C3 (macrófagos).....	62
Figura 46- Citotoxicidade do composto D1 (macrófagos).....	63
Figura 47- Citotoxicidade do composto D2 (macrófagos).....	64
Figura 48 Citotoxicidade do composto D3 (macrófagos).....	65
Figura 49- Citotoxicidade do composto E1 (macrófagos).....	66
Figura 50- Citotoxicidade do composto E2 (macrófagos).....	67
Figura 51- Citotoxicidade do composto E3 (macrófagos).....	68
Figura 52- Citotoxicidade do composto A1 (fibroblastos).....	70
Figura 53- Citotoxicidade do composto A2 (fibroblastos).....	71
Figura 54 Citotoxicidade do composto B3 (fibroblastos).....	72
Figura 55- Citotoxicidade do composto C1 (fibroblastos).....	73
Figura 56- Citotoxicidade do composto C3 (fibroblastos).....	74
Figura 57- Citotoxicidade do composto D1 (fibroblastos).....	75
Figura 58- Citotoxicidade do composto D2 (fibroblastos).....	76
Figura 59- Citotoxicidade do composto D3 (fibroblastos).....	77
Figura 60- Citotoxicidade do composto E1 (fibroblastos).....	78
Figura 61 Citotoxicidade do composto E2 (fibroblastos).....	79

Figura 62- Citotoxicidade do composto E3 (fibroblastos).....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-. Nomenclatura e composição dos compostos.....23

Tabela 2- Valores da IC50 dos 15 compostos testados.....57

Tabela 3-Valores de IC50 da citotoxicidade contra macrófagos.....69

Tabela 4-Valores de IC50 da citotoxicidade contra fibroblastos.....81

LISTA DE ABREVIATURAS

LV	Leishmaniose Visceral
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
DALY	Disability-Adjusted Life Years
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
DMSO	Dimetilsulfóxido
SFB	Soro Fetal Bovino
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
MTT	Brometo de Tetrazolium
IC50	Concentração inibitória de 50% dos parasitos
Sbv	Antimoniato Pentavalente
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Fe	Ferro
Ni	Níquel
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
nM	Nanômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Leishmanioses.....	8
1.2 Leishmaniose Visceral no Brasil	9
1.3 Etiologia e vetores	10
1.4 Reservatórios para a LV.....	12
1.5 Ciclo biológico do parasito e aspectos clínicos.....	13
1.6 Coinfecção com HIV.....	16
1.7 Controle	16
1.8 Diagnóstico e Tratamento da LV.....	17
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Parasitos.....	23
3.2 Compostos	23
3.3 Preparação das promastigotas.....	24
3.4 Diluição dos compostos.....	24
3.5 Ensaio com as promastigotas.....	25
3.6 Ensaio de citotoxicidade.....	25
3.7 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS	
4.1 Atividade leishmanicida dos compostos de bases de Schiff complexados ou não a metais.....	28

5.1.1. Atividade <i>in vitro</i> do composto A2 contra promastigotas	28
5.1.2. Atividade <i>in vitro</i> do composto A2 contra promastigotas.....	30
5.1.3. Atividade <i>in vitro</i> do composto A3 contra promastigotas.....	32
5.1.4. Atividade <i>in vitro</i> do composto B1 contra promastigotas.....	33
5.1.5. Atividade <i>in vitro</i> do composto B2 contra promastigotas.....	35
5.1.6. Atividade <i>in vitro</i> do composto B3 contra promastigotas.....	37
5.1.7. Atividade <i>in vitro</i> do composto C1 contra promastigotas.....	39
5.1.8. Atividade <i>in vitro</i> do composto C2 contra promastigotas	41
5.1.9. Atividade <i>in vitro</i> do composto C3 contra promastigotas	42
5.1.10. Atividade <i>in vitro</i> do composto D1 contra promastigotas.....	44
5.1.11. Atividade <i>in vitro</i> do composto D2 contra promastigotas.....	46
5.1.12. Atividade <i>in vitro</i> do composto D3 contra promastigotas.....	48
5.1.13. Atividade <i>in vitro</i> do composto E1 contra promastigotas.....	50
5.1.14. Atividade <i>in vitro</i> do composto E2 contra promastigotas.....	52
5.1.15. Atividade <i>in vitro</i> do composto E3 contra promastigotas.....	54
5.1.16. Resumo dos valores encontrados para concentração inibitória de 50 % das células.....	56
5.2. Citotoxicidade dos compostos frente a macrófagos.....	57
5.2.1. Atividade <i>in vitro</i> do composto A1 contra macrófagos.....	57
5.2.2. Atividade <i>in vitro</i> do composto A2 contra macrófagos	58
5.2.3. Atividade <i>in vitro</i> do composto B3 contra macrófagos	59
5.2.4. Atividade <i>in vitro</i> do composto C1 contra macrófagos.....	60
5.2.5. Atividade <i>in vitro</i> do composto C3 contra macrófagos	61
5.2.6. Atividade <i>in vitro</i> do composto D1 contra macrófagos	62
5.2.7. Atividade <i>in vitro</i> do composto D2 contra macrófagos	63
5.2.8. Atividade <i>in vitro</i> do composto D3 contra macrófagos	64

5.2.9.	Atividade <i>in vitro</i> do composto E1 contra macrófagos	65
5.2.10.	Atividade <i>in vitro</i> do composto E2 contra macrófagos	66
5.2.11.	Atividade <i>in vitro</i> do composto E3 contra macrófagos.....	67
5.2.12.	Valores de IC50 da citotoxicidade contra macrófagos.....	68
5.3.	Citotoxicidade dos compostos frente a fibroblastos	69
5.3.1.	Atividade <i>in vitro</i> do composto A1 contra fibroblastos.....	69
5.3.2.	Atividade <i>in vitro</i> do composto A2 contra fibroblastos	70
5.3.3.	Atividade <i>in vitro</i> do composto B3 contra fibroblastos.....	71
5.3.4.	Atividade <i>in vitro</i> do composto C1 contra fibroblastos.....	72
5.3.5.	Atividade <i>in vitro</i> do composto C3 contra fibroblastos.....	73
5.3.6.	Atividade <i>in vitro</i> do composto D1 contra fibroblastos.....	74
5.3.7.	Atividade <i>in vitro</i> do composto D2 contra fibroblastos.....	75
5.3.8.	Atividade <i>in vitro</i> do composto D3 contra fibroblastos	76
5.3.9.	Atividade <i>in vitro</i> do composto E1 contra fibroblastos.....	77
5.3.10.	Atividade <i>in vitro</i> do composto E2 contra fibroblastos.....	78
5.3.11.	Atividade <i>in vitro</i> do composto E3 contra fibroblastos	79
5.3.12.	Valores de IC50 da citotoxicidade contra fibroblastos	80
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÃO.....	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

Doenças tropicais negligenciadas são doenças diversas com incidência em populações mais pobres e com pouco investimento da indústria farmacêutica. As 17 doenças consideradas como negligenciadas abrangem mais de 1,4 bilhões de pessoas. As Leishmanioses estão incluídas na lista destas doenças, e tem ocorrência em regiões tropical e subtropical (WHO, 2015), sendo a segunda doença parasitária de maior incidência no mundo (BARRETT & CROFT, 2012). Esta é prevalente em 98 países, sendo estes, os países menos desenvolvido ou em desenvolvimento (ALVAR et al., 2012). Em seres humanos pode apresentar se de duas formas: Tegumentar (Cutânea, MucoCutânea e Cutânea difusa) e a forma Visceral, esta última sendo a de maior gravidade (CLABORN, 2012). Existem 23 diferentes espécies protozoários do gênero *Leishmania* que podem levar a estas diferentes formas da doença. A transmissão dos parasitos ocorre por meio de mosquitos fêmeas da família dos flebotomíneos (PEARSON, et al., 1999; BARRETT & CROFT, 2012).

A Leishmaniose tem um caráter rural e algumas de suas características dificultam as intervenções em larga escala, como a dificuldade em se obter a real estatística da doença. Sua incidência é geograficamente heterogênea, isto é, as taxas de uma região podem ser baixas, e áreas focais com grande ocorrência (BERN et al., 2005; BERN & CHOWDHURY, 2006). Além da dificuldade por ter tantas formas variadas, de acordo com a espécie e patogenicidade das espécies de *Leishmania*, cada uma apresenta diagnóstico distinto, com tratamento prolongado e oneroso. Atualmente o DALY (*Disability-Adjusted Life Years*) é utilizado para expressar os anos de vida perdidos devido a problemas de saúde, incapacidade ou morte precoce (WHO, 2015). A estimativa do número de DALY para as Leishmanioses nas Américas é de 45.000 (WHO, 2010). Portanto, analisando os dados cada pessoa acometida pela Leishmaniose perde por volta de 10 anos de sua vida produtiva.

A distribuição de Leishmanioses cresce desde 1993, com o crescimento dos casos com diagnósticos confirmados (DESJEUX, 2001). A expansão do número de casos não é totalmente conhecida, sendo que a notificação é obrigatória em apenas 33 países (WHO, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estão expostas a Leishmaniose, e cerca de 12 milhões estejam infectadas, ocorrendo 1,3 milhões de novos casos por ano e 20.000 a 30.000 óbitos por ano. Destes, 300.000 são casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 1 milhão Leishmaniose Cutânea (WHO, 2015). Um fator associado foi o aumento da infecção de HIV (Vírus

da Imunodeficiência Humana) na América do Sul, Ásia, e África, por esta ter se expandido mundialmente. Esta infecção com vírus aumenta a susceptibilidade das pessoas ao parasito da LV, complicando e aumentando a fisiopatogênese da LV.

1.2 Leishmaniose Visceral no Brasil

A LV tem ocorrência em 69 países (FAUCHER & PIARROUX, 2011). O Brasil é o terceiro foco de LV no mundo, e nas américas é responsável por 90% dos casos de LV (BRASIL, 2014). Sendo que, entre os anos de 2007 e 2013 foram notificados 26.112 casos (Sistema de Informação de Agravos de Notificações-SINAN). Em 2013 a letalidade foi de 7,1%, com 231 óbitos e um total de 3.253 casos confirmados de LV (BRASIL, 2013), tendo ocorrência em 22 unidades federativas, em todas as 5 regiões do Brasil, sendo o Nordeste a região com maior prevalência dos casos (figura 1) (BRASIL, 2011).

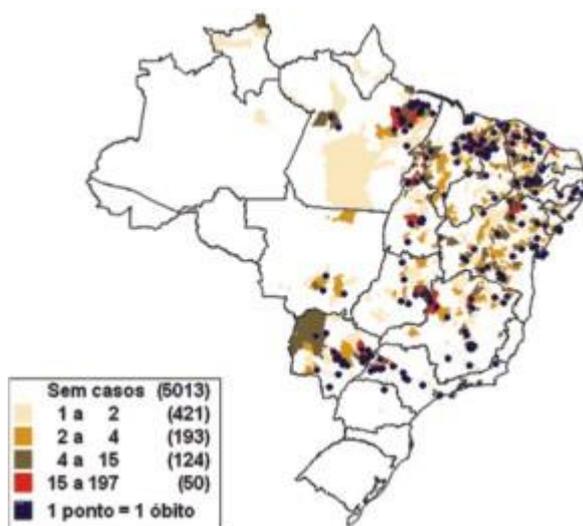


Figura 1: Distribuição de casos notificados no Brasil em 2006.

Fonte: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa71_lva.htm

A LV pode ocorrer em qualquer faixa etária, contudo, as crianças têm um risco elevado para o desenvolvimento da doença, sendo com idade entre 5 anos ou menos as mais acometidas (XAVIER-GOMES et al., 2009; BARBOSA & COSTA, 2013). Em seu estudo, Caldas e colaboradores (2013), demonstraram a ocorrência de maiores recidivas em crianças menores de um ano de idade. Em estudos epidemiológicos nos anos de 2001 a 2007, as principais faixas etárias a ir a óbito eram menores de 1 ano ou com mais de 50 anos de idade (BRASIL, 2011). Essa

característica se deve a imaturidade da imunidade celular, podendo se agravar com a imunodepressão do sistema imune através da desnutrição (SILVA, et al., 2001). Caso não recebam tratamento, as pessoas com LV vem a óbito em um período de 2 anos (WHO, 2010).

No Brasil o primeiro registro de caso de LV foi em 1913 (ALENCAR & DIETZE, 1991), ocorrendo um crescente número de casos e epidemias rurais em ciclos de 10 anos, o que tem se expandido para áreas urbanas. Essa mudança no padrão da doença se deve à grande migração da população do ambiente rural para as cidades, provocando locais densamente povoados (WHO, 2010). Portanto o rápido crescimento, degradação ambiental, condições precárias, falta de saneamento básico e coleta de lixo, além do contato com cães e outros animais domésticos conduziram a proliferação dos vetores e a transmissão de doenças nesses locais (COSTA et al., 2005; WENECK et al., 2007). Esta doença ainda tem sua importância epidemiológica não totalmente elucidada, pela subnotificação e infecções subclínicas (HARHAY, et al., 2011).

1.3 Etiologia e vetores da Leishmaniose Visceral

O agente etiológico das Leishmanioses é o protozoário intracelular obrigatório do sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Tripanosomidae, do gênero *Leishmania* (DESJEUX, 2004). Cunningham, em 1885, na Índia descreveu formas amastigotas proveniente de materiais de pacientes com LV, descrevendo assim os agentes causadores das Leishmanioses.

No novo mundo, incluindo o Brasil, o agente etiológico da LV é a espécie *Leishmania chagasi* (BRAGA et al., 1986). No velho mundo é a *L. donovani*. Esse parasito tem o ciclo dimórfico (SACKS & KAMHAWI, 2001), apresentando duas formas morfológicas: a promastigota (Figura 2), cuja qual é flagelada, alongada e móvel, presentes nos vetores, é a forma infectante para os hospedeiros vertebrados, e a forma amastigota (Figura 3), arredondada, que parasita células do sistema fagocitário do hospedeiro vertebrado (CHANG et al., 1990; CUNNIGHAM, 2002). Tolezano e colaboradores (2007) registraram o primeiro caso de dois cães com sinais clínicos de LV infectado com *L. amazonensis* em Araçatuba, Estado de São Paulo, o que pode mostrar um agravamento da falha no diagnóstico nesses animais, que tiveram resultados negativos na sorologia, o teste diagnóstico mais realizado para diagnóstico canino. Esta espécie de *Leishmania* tem um variado espectro de quadros clínicos, e já foi isolada de seres humanos com sintomatologia de LV, Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Mucosa (ALMEIDA et al., 1996).

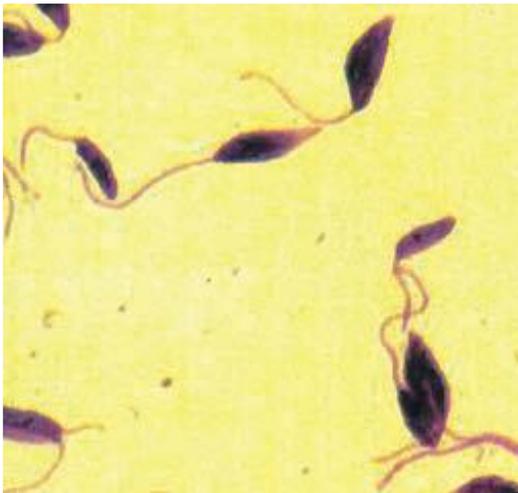


Figura 2: Formas promastigota do parasito.

Fonte: Brasil, 2014.

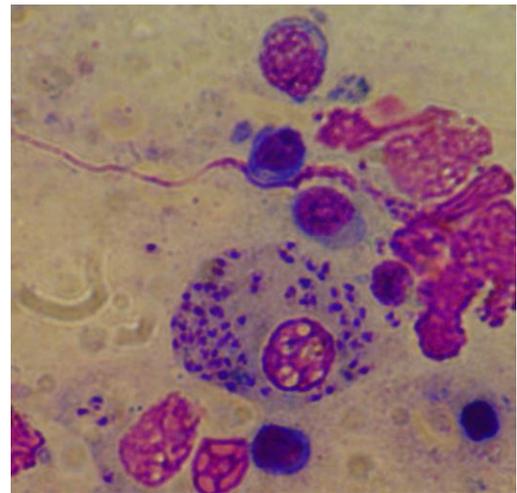


Figura 3: Formas amastigotas do parasito.

Fonte: arquivo pessoal.

Os vetores das Leishmanioses são Flebotomíneos (Figura 4), com hábitos de ficar em toca de roedores, cupinzeiros e em restos orgânicos, encontrados em regiões com clima quente e úmido (BRYCESON, 1996). Em seu estudo, Macedo e colaboradores (2008) observaram que a temperatura foi determinante para a incidência da LV, pontuando a chuva como um fator importante para a população de Flebotomíneos nessas regiões. Entretanto, estes flebotomíneos podem variar suas preferências de clima e umidade dependendo da adaptação de acordo com o ambiente em que persistem (COSTA et al., 2013). Estes insetos apresentam hábitos crepusculares e noturnos, sendo o período de maior atividade das 17 horas às 5 horas (FAUCHER & PIARROUX, 2011). Os machos só se alimentam de seiva, contudo, as fêmeas precisam de sangue para maturação dos ovos (BARATA et al., 2005), e são responsáveis pelo ciclo dessa doença.



Figura 4: *Lutzomyia longipalpis*.

Fonte: Brasil, 2014.

No Brasil, a *Leishmania chagasi* é transmitida primariamente pela espécie *Lutzomyia longipalpis* (ROMERO & BAELAERT, 2010). Apesar desse parasito já ter sido isolado de outras espécies, como: *Lutzomyia cruzi*, *Lz. evansi*, *Lz. forattinii* e *Lz. migonei*, entretanto, nem todas essas foram descritas como vetores propriamente ditos e com importância epidemiológica para o desenvolvimento da LV (SANTOS et al., 1998; MONTOYA-LERMA et al., 2003; CARVALHO et al., 2010; SALOMÓN et al., 2010). Ainda há um escasso número de estudos sobre a importância da *Lz. longipalpis* em algumas regiões de nosso país, por exemplo na região mais afetada, o Nordeste (AMÓRA et al., 2010). A maioria dos estudos se concentram no sudeste do país, onde já foi bem relacionada a densidade desse Flebotomíneo e a Leishmaniose Visceral canina (FRANÇA-SILVA et al., 2005).

Em seu estudo, Galati e colaboradores (1997) descrevem a *Lz. cruzi* como sendo a principal espécie transmissora, dentro e fora das casas na cidade de Corumbá, Estado de Mato Grosso do Sul. Posteriormente na mesma região foi descrita a infecção natural da *L. infantum* nesse Flebotomíneo (SANTOS et al., 1998). Mas, sua prevalência parece estar restrita nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (GALATI et al., 1997; RIBEIRO et al., 2007). Carvalho et al. (2010) descreveram a infecção natural da *Lz. migonei* pela *L. infantum* no estado de Pernambuco, colocando-o como potencial vetor da LV. Estudos em La Banda, Argentina, sugere a *Lz. migonei* sendo a espécie predominante (93%) em áreas com casos autóctones de VL e uma ausência de *Lz. longipalpis* e *Lz. cruzi* (SALOMÓN et al., 2010). Desse modo, observamos que o vetor para transmissão da LV é alterado conforme região geográfica e condições climáticas.

1.4 Reservatórios para Leishmaniose Visceral

No Brasil, a LV acomete animais e seres humanos, sendo, portanto, uma antropozoonose. Entretanto, seres humanos imunocompetentes frequentemente não desenvolvem a doença (ASHFORD, 2000). Já a espécie canina é mais susceptível a manifestar LV canina, sendo apontada como sendo o principal reservatório do ciclo doméstico desta doença. Uma grande porcentagem dos cães infectados com esse protozoário não desenvolvem sinais clínicos, tendo a fase assintomática, e acabam ficando como reservatório por tempo indeterminado, mantendo-se infectante para o Flebotomíneo (ALVES, 2006). No Brasil estima-se em milhões o número de cães infectados por esse parasita, entretanto, não há um dado oficial sobre esse valor (BANETH et al. 2008). A

prevalência em algumas cidades no Brasil varia entre 1,9% a 51,35% (FRANÇA-SILVA et al., 2003, MORAIS et al., 2013).

Contudo outras espécies de mamíferos também podem ser hospedeiros desse protozoário (CAMARGO-NEVE, 2004). Podendo ocorrer em animais domésticos ou selvagens. Solano-Gallego e colaboradores (2007), na Espanha, identificaram anticorpos através de ELISA e Western Blot em gatos domésticos. Em Portugal, felinos domésticos com PCR positivo não desenvolviam sintomatologia clínica da LV (MAIA et al., 2008). No Brasil, Sousa e colaboradores (2014) detectaram 6,6% de anticorpos em 151 gatos provenientes de Campo Grande (MS). Alguns estudos também comprovaram a infecção de *Leishmania infantum* em equinos, pelo método diagnóstico ELISA com soroprevalência similar a espécies canina e felina no município de Araçatuba (SP) (FEITOSA et al., 2012). Na Europa, foram descritos alguns casos de equinos com Leishmaniose Cutânea infectados com *Leishmania infantum* (KOEHLER et al., 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2003; ROLÃO et al., 2005). Entretanto, a imunidade celular dessa espécie de mamífero mostrou ser efetiva, esclarecendo a falta de susceptibilidade (FERNANDEZ-BELLON et al., 2006). Moreno e colaboradores (2014), em seu estudo, na Espanha detectaram anticorpos para *L. infantum* em gatos, coelho e lebres, sendo essa última espécie com maior soropositividade e maiores titulações, e permanecendo assintomáticos. Há relatos de infecção em carnívoros silvestres em várias áreas endêmicas para LV: Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), Chacal (*Canis aureus*), Raposas (*Vulpes vulpes*) (ABRANCHES et al., 1984; ELNAIEM et al., 2001; MOHEBALI et al., 2005; SOBRINO et al., 2008). Ressalta-se que, em algumas dessas áreas, a densidade desses carnívoros silvestres pode ser maior que a de cães domésticos (SOBRINO et al., 2008). Assim, todos os animais citados anteriormente contribuem para o ciclo de vida deste parasita e manutenção das espécies nas áreas rurais e periurbanas.

1.5 Ciclo biológico do parasito e aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral

Durante o repasto sanguíneo, do inseto as formas promastigotas metacíclicas, formas infectantes são transmitidas ao hospedeiro invertebrado e são internalizadas por macrófagos e outras células dendríticas, pelo mecanismo de fagocitose. Dentro do macrófago as promastigotas se diferenciam na forma amastigota do parasito e se multiplicam levando ao rompimento dos macrófagos, sendo liberadas e aptas a invadir outras células (NOLI, 1999; WHO, 2002). Ao fazer o repasto sanguíneo, outro Flebotomíneo ingere as formas amastigotas, estas se diferenciam em

formas promastigotas no trato digestivo anterior e por divisão binária se reproduzem, permanecem aderidas a microvilosidades do intestino médio do inseto, posteriormente se diferenciam em promastigotas metacíclicas, e se dirigem para a probóscida do inseto (PETERS et al., 2008). E durante o repasto sanguíneo as fêmeas regurgitam as promastigotas no indivíduo, infectando-o (figura 5).

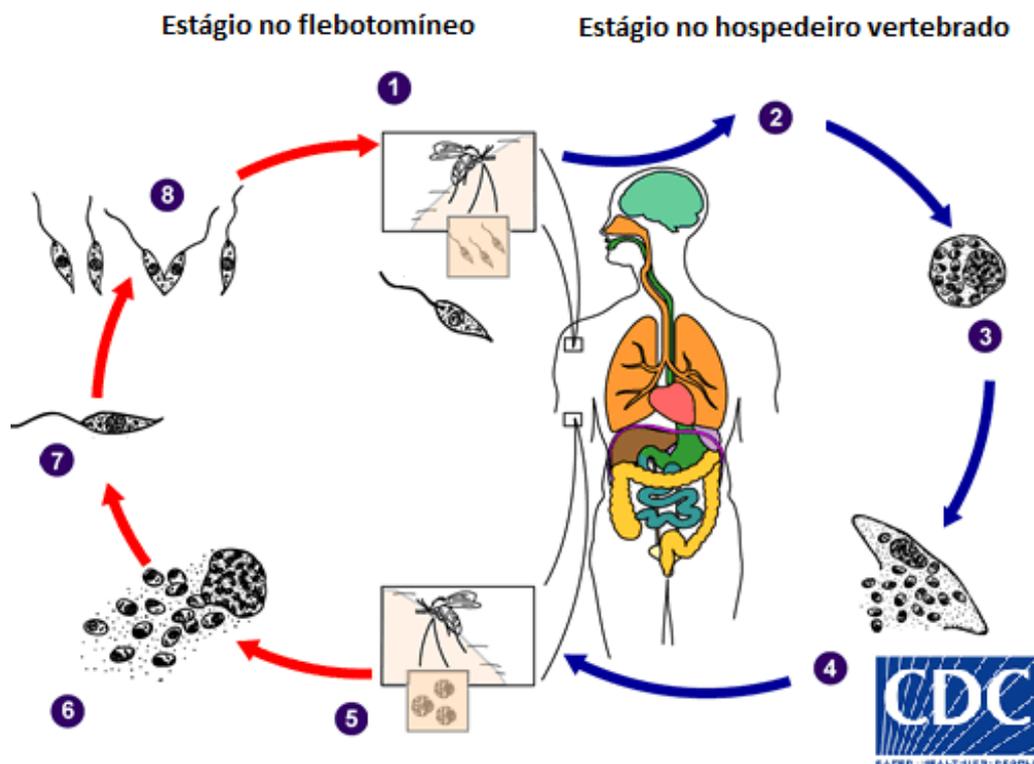


Figura 5: Ciclo biológico da Leishmania. (1) Promastigotas são inoculadas no hospedeiro vertebrado (2) Promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células mononucleares. (3) Promastigotas se diferenciam em amastigotas, por divisão simples se multiplicam. (4) As formas amastigotas infectam novas células. (5, 6) Ao fazer o repasto sanguíneo flebotomíneo ingere as formas amastigotas. (7) As formas amastigotas são transformadas em promastigotas. (8) as formas amastigotas se desenvolvem no intestino e migram para a probóscide dos flebotomíneos.

Fonte: www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html

A apresentação de quadro clínico em seres humanos não é frequente, e quando está presente tem correlação com idade, mal nutrição e imunodepressão, sendo a infecção assintomática muito comum (GRAMICCIA & GRADONI, 2005). A Leishmania tem caráter de infectar diferentes órgãos, podendo ser detectado em quase todas as partes do organismo, a isso se deve a grande variedade de sintomatologia (NOLI, 1999). Os sinais clínicos mais frequentes no homem são: febre progressiva, esplenomegalia, hepatomegalia (Figura 6), perda de peso, hipergamaglobulinemia,

pancitopenia e hemorragias (JERONIMO et al., 2006). Caso não seja tratada, 100% dos casos de LV evoluem para o óbito (DESJEUX, 2002).



Figura 6: Hepato e esplenomegalia.

Fonte: <http://www.who.int/Leishmaniasis/en>

O quadro clínico em cães é semelhante, sendo os sinais clínicos mais comuns a perda de peso (Figura 8), fadiga, linfadenopatia generalizada, lesões oculares, diarreia e sinais dermatológicos como a alopecia, opacidade do pelo, pápulas ou pequenos nódulos, úlceras indolentes (Figura 7), crostas, distúrbios disqueratóticos generalizados (NOLI & AUXILIA, 2005; MOREIRA et al, 2007; MIRÓ et al., 2008). O período de incubação varia de 3 meses a vários anos, com média de 3 a 7 meses (BRASIL, 2014). As taxas de incidência da LV canina podem atingir 60 a 80% da população desses animais de um município (MOURA et al., 1999, SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LACHAUD et al., 2002), sendo que cerca de 40 a 80% dos animais soropositivos podem não apresentar quadro clínico, com sintomatologia específica (NOLI, 1999).



Figura 7: Lesões em periocular e focinho.

Fonte: arquivo pessoal.

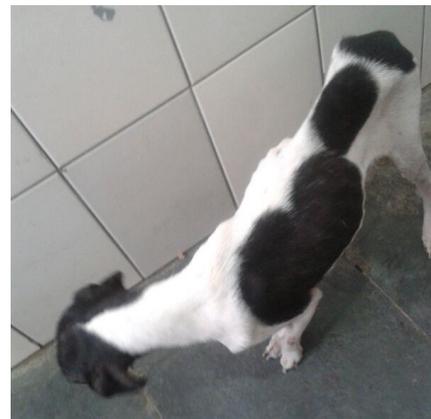


Figura 8: Caquexia.

Fonte: arquivo pessoal.

1.6 Coinfecção da Leishmaniose Visceral com HIV

A coinfecção da LV com o HIV tem ocorrência em 35 países (ALVAR et al., 2008). No Brasil, a prevalência de infecção por HIV é cerca de 34.500 novos casos por ano (BRASIL, 2009). Sendo que sua incidência vem se interiorizando (BRASIL, 2009), em contrapartida com a urbanização da LV (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Esse fato contribui para o aumento dos casos de coinfecção. O quadro clínico é semelhante aos pacientes com LV. Entretanto, pacientes com coinfecção apresentam maiores taxas de recidiva e de letalidade do que pacientes que não tem o vírus (SOUSA-GOMES et al., 2011). O prognóstico é determinado de acordo com a imunidade do paciente, sendo avaliada a contagem de linfócitos T CD4+. Por terem a resposta humoral e a celular debilitadas (MORENO et al., 2000), estes pacientes têm risco maior para o desenvolvimento de LV após infecção com o parasito, maior carga parasitária no sangue, baixa sensibilidade a testes sorológicos e a maiores taxas de falhas terapêuticas (MURRAY, 1999; DENIAU et al., 2003). Ademais, há a necessidade do diagnóstico para optar por uma terapia condizente com cada caso, para observação e tratamento dos efeitos colaterais e à ocorrência de recidivas (BRASIL, 2011). Quando o paciente está em terapia Antirretroviral altamente ativa (HAART) há a proteção para a progressão da doença, já que esta aumenta a produção de citocinas TH1 (de LA ROSA et al., 2002).

1.7 Controle da Leishmaniose Visceral

No Brasil, o controle da LV é embasado no diagnóstico e tratamento dos casos humanos, eutanásia dos cães soropositivos, no combate ao vetor, na vigilância epidemiológica e no manejo ambiental (BRASIL, 2014).

A eliminação dos cães reservatórios é a ação de controle mais criticada, isso por conter algumas limitações, como: o intervalo entre o diagnóstico e a remoção, diagnóstico falho com frequentes falsos positivos ou negativos, reposição de animais rapidamente e proprietários não permitirem a eutanásia de seus cães (BRAGA et al., 1998, OLIVEIRA & ARAÚJO, 2003; MOREIRA et al., 2004). No município de Jequié, estado da Bahia, houve o aumento de número de casos humanos, apesar do programa de controle com eutanásia de 15% da população canina, entre 1992 e 1996 (PARANHOS-SILVA et al., 1998). Moreira e colaboradores (2004) demonstraram que a eutanásia dos cães não diminuiu a ocorrência da LV canina após utilizarem uma intervenção otimizada, realizando o diagnóstico com ELISA, curto período de tempo entre o diagnóstico e a eliminação do animal, abrangendo um alto número da população canina local. Contudo, alguns

estudos mostraram diminuição temporária da LV canina e de casos humanos (ASHFORD et al., 1998). Para proteção individual de cães podem ser utilizados inseticidas tópicos, como piretróides, cujo inibe o repasto sanguíneo do vetor e os intoxicam, fazendo uma barreira na transmissão (GAVGANI et al., 2002). Em um estudo onde aplicaram permetrina 65% em cães uma vez ao mês durante 2 meses consecutivos, a prevalência de LV canina diminuiu em 50%. Em contrapartida, uma outra área da cidade teve aumento nos casos (GRIFFONI et al. 2002). Outra alternativa para ser utilizado em cães são as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% que individualmente reduz a prevalência da parasitose em cães (DAVID et al., 2001; MAROLI et al., 2001; REITHINGER et al., 2004). Contudo, a eficácia deste método é dependente de uma cobertura canina elevada e por um período indeterminado (GAVGANI et al., 2002).

Outra estratégia é o combate ao vetor onde, algumas pesquisas apresentam alguns inseticidas tendo eficácia para o controle vetorial. Como óleos essenciais provenientes de três espécies de *Eucalyptus spp*, agindo contra a *L. longipalpis*, nos estágios de ovos, larvas e adultos (Maciel et al., 2010). Ainda, no estudo de Silva e colaboradores (2007) comprovaram a diminuição da densidade do vetor após a aspersão de alfacipermetrina a cada 4 meses nas 4 estações do ano.

Ainda, Costa et al. (2005) avaliaram a influência dos serviços e saneamento básicos da cidade de Teresina, e observaram maior risco de infecção humana quando há ausência de rede de esgoto e coleta de lixo regulares. (COSTA et al., 2005). Além disso, é imprescindível desenvolver um plano para orientar a população sobre a doença. Nunes e colaboradores (2008) sugeriram que a falta de informação é um obstáculo para a prevenção da LV, bem como a educação de guarda responsável dos animais (ANDRADE et al., 2007). Em um estudo em Belo Horizonte, foram considerados deficientes as informações que a população tinha sobre LV, sendo que metade dos entrevistados já haviam sido infectados (BORGES, 2006).

1.8 Diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Visceral

O diagnóstico da LV é realizado através da sintomatologia associada com exames laboratoriais, para exclusão de diagnóstico diferencial de doenças com quadro clínico similar (SUNDAR & RAI, 2002). Alguns exames que podem ser utilizados são: parasitológico, cultura, exame de imunofluorescência (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia de polimerase (PCR).

Para o tratamento da LV humana há algumas opções terapêuticas, como antimoniais pentavalente, anfotericina B convencional ou lipossomal, isotionato de pentamidina.

O antimoniato de N-metil Glucamina é um antimonial pentavalente (Glucantime®), utilizado para o tratamento de LV em muitos países do mundo. Seus pontos negativos são a necessidade de administração por tempo prolongado, em altas doses e de forma parental, apresentando altos índices de desenvolvimento de resistência e efeitos colaterais severos, principalmente renal e cardíaco (PLANO et al., 2011). Os antimoniais pentavalentes (Sbv) são pró-fármacos, pois através da glutathione são transformados na sua forma ativa. Ele altera o metabolismo bioenergético das amastigotas, por interferir na glicólise, via dos ácidos graxos, tripanotona e no DNA topoisomerase do parasita (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001). Apesar de ser muito utilizado, sua eficácia difere de acordo com a etiologia da doença, sendo pouco utilizada na Índia por sua baixa eficácia contra a *L. donovani* (OLLIARO et al., 2005). Sua eficácia no Brasil é de 84% (OLIVEIRA-NETO et al., 1997). A taxa global de cura é 90%. O tratamento inicial é 20mg/kg peso corpóreo, diariamente (menor que 850mg), durante 28 a 30 dias (BRASIL, 2011). Os efeitos colaterais mais comuns são: anorexia, vômito, náuseas, dor abdominal, mialgia, artralgia, dor de cabeça, letargia e gosto metálico. Apesar de pouco frequentes podem ocorrer cardiotoxicidade e morte súbita, portanto sempre é necessário o uso de eletrocardiograma preventivo. Paciente com menos de 2 anos e mais de 45 anos de idade com quadro clínico de LV avançado e/ou má nutrição apresentam maiores riscos de morte durante o tratamento com antimoniato, complicação da LV, além de diminuição da ação ou uma combinação desses fatores (SEAMAN et al., 1996; COLLIN et al., 2004). Também foi desenvolvido antimoniato de meglumina encapsuladas em lipossomas, esta teve eficácia quando testada *in vitro* em amastigotas de *L. major*, com uma atividade leishmanicida maior que a convencional (BORBOREMA et al., 2011).

A anfotericina B é um antifúngico isolado do *Streptomyces nodosus*, é utilizado desde os anos de 1960. Seu mecanismo de ação é ligar-se ao ergosterol da membrana do parasita, alterando assim sua permeabilidade, por levar a perda de cátions, principalmente de K⁺ (ORDONEZ-GUTIERREZ et al., 2007). Porém é pouco solúvel em água e tem baixa biodisponibilidade e apresenta grande toxicidade renal (CRUZ et al., 2009). Também podem ocorrer reações no momento da aplicação, como tromboflebite e febre alta (WHO, 2011). O Ministério da Saúde recomenda a administração via intravenosa diluída em soro glicosado e infundida em 4 horas, com uma dose de 1 mg/kg de peso corpóreo, uma vez ao dia durante 14 a 20 dias (BRASIL, 2011). Com o protocolo de

administração com uma dose de 0,75 a 1 mg/kg por dia durante 1 a 20 dias, a taxa de cura na Índia foi de 99% (WHO, 2011). É importante uma hidratação adequada e reposição de potássio quando necessária (WHO, 2011).

Mais recentemente foram adicionados ao mercado 3 formulações lipídicas da anfotericina B, essas apresentam melhor biodisponibilidade e menos efeitos colaterais. É a droga de primeira escolha nos Estados Unidos. A maioria dos estudos foram utilizados a AnfB lipossomal, que tem partículas composta por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol e AnfB. (PLANO et al., 2011). No Brasil, há a recomendação de ser administrado por via intravenosa durante 2 horas, com a dose de 3 mg/kg durante 7 dias, ou 4mg/kg durante 5 dias (BRASIL, 2011). Na região do mediterrâneo com uma dose total de 20mg/kg com 2 administrações a taxa de cura foi de 96%. Podem ocorrer reações leves a administração, além de nefrotoxicidade ou trombocitopenia transitória (WHO, 2011). Em um ensaio clínico com uma dose de 14 mg/kg foi capaz de curar 100% dos pacientes na Índia e na Quênia, entretanto só 62% dos pacientes no Brasil. Essa discrepância se deve pela diferença de espécies de *Leishmania* ou também pela diferença genética de cada população dessas áreas (BERMAN et al., 1998). Segundo a OMS esse medicamento é a melhor opção para os casos de coinfeção com o HIV (WHO, 2007). A desvantagem desse medicamento é o seu custo oneroso (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

A pentamidina era utilizada, entretanto por sua baixa eficácia e efeitos colaterais (nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hipoglicemia, entre outras) está em desuso para a LV. É administrado por via intramuscular ou intravenosa (WHO 2011). Foi utilizada em pacientes refratários ao antimoniato, contudo a sua taxa de cura caiu rapidamente de 95% para 70% (JHA et al., 1991). O seu mecanismo de ação não é totalmente esclarecido, mas está envolvido com o transporte de aminoácido, e pode ligar se ao DNA do cinetoplasto do parasito e diminuem o potencial de membrana mitocondrial (KAUR & RAJPUT, 2014).

Paromomicina (aminosidina) é administrada por via intramuscular. Também pode ser utilizado, mas dor no local da aplicação é um efeito colateral comum (55%), 2% dos pacientes apresentam ototoxicidade reversível, e alguns apresentam hepatotoxicidade. O mecanismo de ação sugerido é a disfunção do ribossomo mitocondrial e despolarização da membrana mitocondrial (CROFT et al., 2006). Tem se mostrado eficaz na Índia, com uma dose 15mg/kg por dia durante 21 dias a taxa de cura foi de 93 a 95% (WHO, 2011). Na África Oriental com uma dose maior (de 20)

a taxa de cura foi de 85% (WHO, 2011). Em um estudo na Índia com tratamento utilizando uma dose de 16mg/kg durante 21 dias, apresentou taxa de cura de 93% (JHA et al., 1998).

A miltefosina começou a ser muito utilizada para tratamento de câncer, contudo mostrou boa atividade leishmanicida, é administrada por via oral (CHAPPUIS et al., 2007). Algumas das hipóteses para o mecanismo de ação são: por ser anfifílicas, se acumulam na membrana plasmática, alterando sua fluidez (PARIS et al., 2004) além de induzir a morte por apoptose (MORE et al., 2003). A sensibilidade da *L. donovani* foi demonstrada *in vitro*, com valor de IC50 de 0,12 a 0,132 μ M para promastigotas 1,2 a 4,6 μ M contra amastigotas (PEREZ-VICTORIA et al., 2003). Também foi demonstrado sensibilidade tanto de cepas Sbv sensível como resistente, isolados de pacientes do Nepal (YARDLEY et al., 2005). A sua taxa de cura foi de 94% na Índia e 90% na Etiópia (WHO, 2011). Em estudo de fase 4, na Índia, a taxa de cura foi de 82%, com apenas 3 mortes, e apenas 3% dos pacientes apresentaram efeitos colaterais como gastrointestinal grave e aumentos nos níveis de aspartato aminotransferase, alanina amino transferase e creatinina (BHATTACHARYA et al., 2007). Os efeitos colaterais descritos são anorexia, náuseas, vômitos (38%), diarreia (20%). Este medicamento é teratogênico, não podendo ser utilizado por mulheres grávidas, ou que estão em período fértil sem adequado uso de contraceptivos (WHO, 2011). A resistência a miltefosina é facilmente induzida *in vitro* e tem um custo oneroso (THAKUR, 2000).

A sitamaquina é um composto que foi avaliado em ensaios de fase 2 para o tratamento de LV. Entretanto, ainda há escassez de estudos envolvendo esta molécula. A IC50 para amastigotas da *L. donovani* foi de 1,5 μ M (NEAL & CROFT, 1984) e contra a *L. tropica* de 2,6 μ M (BERMAN & LEE, 1983).

Como alternativa, alguns produtos naturais são testados e acabaram mostrando atividade, como as chalconas, flavonoides, ligninas, entre outros (SALEM & WERBOVETZ, 2006).

O uso de combinação de mais de um fármaco é uma alternativa para reduzir o custo e o tempo do tratamento e também o desenvolvimento de resistência (BRYCESON, 2001). A associação de Estibogluconato de sódio e paromomicina mostrou-se segura e eficaz nos primeiros ensaios realizados na África e na Índia (CHUNGE et al., 1990; THAKUR et al., 2000). Em um estudo randomizado, 156 pacientes foram alocados em três grupos, tratados somente com Sbv, tratados com Sbv e com interferon por 15 dias, e os tratados com com Sbv e interferon por 30 dias. No grupo tratado somente com Sbv a taxa de cura foi de 136%, enquanto nos outros dois grupos a taxa foi de 42 e 49%, respectivamente (SUNDAR et al., 1997).

Na medicina antiga, os metais eram utilizados em medicamentos, porém foram abandonados pelo receio com sua toxicidade e pelo avanço da química orgânica (NAVARRO et al., 2010). Entretanto, vem se tornando uma boa alternativa, especialmente como agentes anticancerígeno e antiparasitário (JENNETTE et al., 1974; ZHANG & LIPPARD, 2003; NAVARRO et al., 2010). Um complexo com ósmio (III) inibiu o crescimento de *L. donovani* após 48h (CASTILLA et al., 1996). Complexos com Ouro (III), paládio (II) e rênio (V) inibiram a protease de cisteína dos parasitas testados (*L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani*) (FRICKER et al., 2008). Quatro complexos com Cobre apresentaram atividade leishmanicida contra *L. braziliensis*, associada com a capacidade de os complexos interagirem com o DNA como intercaladores de DNA (NAVARRO et al., 2003). Complexos de Cobre e cobalto contendo ligantes da classe de pirimidinas tiveram alta atividade contra *L. infantum* e *L. braziliensis*, interferindo com o metabolismo de energia do parasita (RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2011). Uma boa alternativa de complexo utilizando metais são as bases de Schiff, que são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um grupo $R_2C=N$, em que R=H ou aril e são formadas a partir da condensação de uma amina primária com um grupo carbonila (IUPAC, 1999). As bases de Schiff são consideradas importantes na química de coordenação por formar complexos estáveis com vários metais de transição (CIMERNMAN et al., 1997).

Um grande obstáculo para a eficácia do tratamento para o controle da LV é o uso inadequado dos medicamentos. Segundo Sundar e colaboradores (1994) apenas 26% dos pacientes tratados com antimoniato recebeu o tratamento de acordo com as recomendações da OMS. Além da produção inadequada dos fármacos, gerando medicamentos de qualidade inferiores e/ou com maior toxicidade (SUNDAR et al., 1998). No Brasil, em 2010 93,1% dos pacientes notificados com LV neste ano foram utilizados como medicamento: 75,5% destes receberam tratamento com antimoniato de meglumina, 12,7% com desoxicolato de anfotericina B, 0,1% com anfotericina B lipossomal, entre outros (PELISSARI et al., 2011). Toda a disponibilidade de fármacos e diferenças entre os tratamentos nas diversas populações ao redor do mundo, nos faz pensar na importância de novos fármacos que possibilite a cura desses indivíduos. Dessa forma, avaliar novos complexos terapêuticos associados ou não a metais poderá contribuir com a busca de novos fármacos para o tratamento e controle da LV, principalmente no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida de alguns compostos de bases de Schiff complexados ou não com metais, contra promastigotas de *L. chagasi in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1. Avaliar atividade dos 15 compostos em inibirem a cultura das formas promastigotas da *L. chagasi in vitro*, utilizando o método colorimétrico para analisar a viabilidade celular.
- 2.2.2. Calcular a concentração inibitória de 50% de viabilidade do parasito (IC50) para os compostos que demonstraram alguma atividade leishmanicida.
- 2.2.3. Avaliar a citotoxicidade de 11 compostos frente a linhagem J774 A1, de macrófago e frente a linhagem L929 de fibroblasto.
- 2.2.4. Calcular a concentração citotóxica 50% (CC50) dos compostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

A cepa de *Leishmania chagasi* foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP).

3.2 Compostos

Foram testados 15 compostos provenientes da reação de condensação entre salicilaldeído e aminas aromáticas complexadas com metais pesados (Ferro, níquel, zinco, Cobre). Os compostos foram disponibilizados pelo Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues do Laboratório de Materiais Híbridos da Universidade Federal da Grande Dourado (UFGD).

Tabela 1. Nomenclatura e composição dos compostos.

A1	Methoxy + Zn
A2	N-Salicilidenoanilina + Zn
A3	P-Nitrosalicilidenoanilina+ Zn
B1	Methoxy+ Ni
B2	N-Salicilidenoanilina + Ni
B3	P-Nitrosalicilidenoanilina+ Ni
C1	Methoxy + Fe
C2	N-Salicilidenoanilina + Fe
C3	P-Nitrosalicilidenoanilina + Fe
D1	Methoxy + Cu
D2	N-Salicilidenoanilina + Cu
D3	P-Nitrosalicilidenoanilina + Cu
E1	Methoxy
E2	N-Salicilidenoanilina
E3	P-Nitrosalicilidenoanilina

3.3 Preparação das promastigotas

A cepa sensível a óxido nítrico foi cultivada em garrafas de cultura celular de 25 mL sem filtro. Utilizando o meio 199 (Figura 9) (SIGMA ALDRICH), com adição de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor, penicilina e estreptomicina (SIGMA ALDRICH) e 2% urina de indivíduos do sexo masculino, com faixa etária de 22 a 30 anos de idade. Para manutenção da cepa, parte desta foi conservada em temperatura igual a -80° C. Para o congelamento foi utilizado uma solução estéril, constituída por 5 mL de DMSO e 45 mL de SFB inativado.

Foram utilizadas placas com 96 poços. As promastigotas foram contadas utilizando câmara de Neubauer e adequadas à concentração de 1.10^7 promastigotas mL^{-1} . As promastigota não foram contabilizadas quando elas estavam aderidas as outras, através do flagelo ou do corpo celular, formando as rosetas (figura 9) (SIFAOU I et al., 2014).

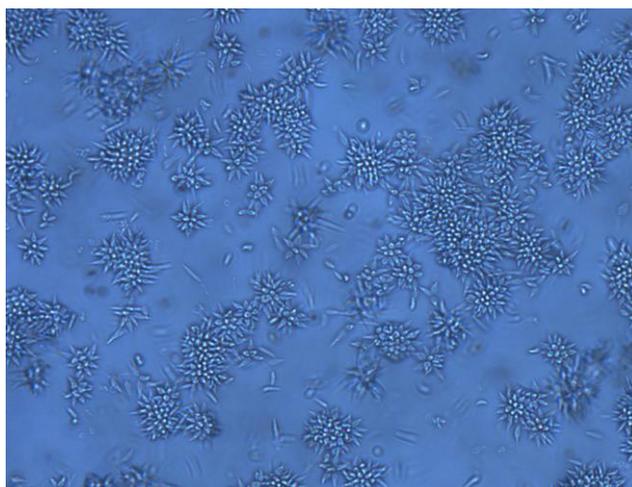


Figura 9: Cultura de promastigota.

Fonte: arquivo pessoal.

3.4 Diluição dos compostos

Cada composto foi pesado e separado 0,002g. DMSO puro foi utilizado para a solubilização, cuja concentração final variou de 4 a 6%, dependente da solubilidade de cada composto. O volume da solução mãe foi completado até 1000 μL com meio completo, obtendo-se assim uma concentração final de 2000 $\mu\text{g/mL}$ de cada composto.

Para os ensaios foram preparadas seis concentrações de cada composto. Para cada concentração foram adicionados 320, 160, 80, 40, 20, 10 μL da solução mãe, completando-se com o meio até um volume final de 1000 μL . As concentrações finais dos compostos obtidas, respectivas a quantidade de solução mãe adicionada, foram de 320, 160, 80, 40, 20, 10 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Ensaio com as promastigotas

Em cada poço da placa foi adicionado 100 μL da diluição de promastigotas (1.10^6 promastigotas) e 100 μL de cada diluição da substância. As placas foram incubadas por 24 horas à temperatura de 23°C (SIFAOUÏ et al., 2014). Para avaliação da viabilidade foi utilizado o teste colorimétrico da resazurina, que por ser um indicador redox, é transformado em fluorescente por uma redução química pelo crescimento das células viáveis. Após o período de incubação, adicionou-se 20 μL de Resazurina (SIGMA ALDRICH), com posterior incubação em um recipiente de alumínio, vedado, cuja concentração de CO_2 foi mantida a 5-10 % com o auxílio de uma vela (CORRAL et al., 2013). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência (SPECTRAMAX M3) com excitação de 540 nm e emissão de 590 nm, com a colaboração do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar.

O experimento foi realizado em sextuplicata. A Anfotericina B (SIGMA ALDRICH) foi utilizada como controle positivo e meio com DMSO na sua maior concentração de cada experimento foi utilizado como controle negativo.

3.6 Ensaio de citotoxicidade dos compostos

Foram utilizadas duas linhagens celulares para o teste de citotoxicidade, a linhagem L929 fibroblasto de camundongo, cedida pelo Prof. Dr. Emanuel Carrilho do Instituto de Química de São Carlos (USP), e a linhagem J774 macrófago de camundongo, cedida pela Prof. Dr. Célio Lopes Silva do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP. As culturas de fibroblasto (figura 10) foram mantidas em meio DMEM, acrescido de SFB 10%v/v, Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B. Os macrófagos (figura 11) foram mantidos em meio RPMI acrescido de SFB 10% v/v. As células foram cultivadas em garrafas de 25mL ou 75mL mantidas em estufa a 5% de CO_2 e 37°C de temperatura até que a monocamada celular esteja confluenta.

Após esse estágio as células foram lavadas com 5ml de PBS estéril e foram adicionado 2mL de tripsina em cada garrafa. Levando ao desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em uma garrafa foi transferida para outras garrafas. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade suficiente de células para os ensaios. Estes foram realizados com suspensão de 4.10^5 células/mL. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e após 24 horas de cultivo foram tratadas com cada composto. Para todos os experimentos as células foram testadas com 6 concentrações de cada composto, procurando avaliar o potencial da citotoxicidade com o efeito dose-resposta. A concentração que induz morte celular em 50% (CC50) das células foi determinada no tratamento de 24 e 48 horas. Os testes foram realizados em dois experimentos independentes. O método colorimétrico de MTT, utilizado para a avaliação de citotoxicidade, tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta. Após o tratamento, o meio de cultura foi retirado e adicionado em cada poço 100 μ L de uma solução de 1mg/ml de MTT, diluído em PBS e meio incompleto. A placa foi incubada em estufa a 37°C, ao abrigo da luz, durante 3 horas. Para a solubilização dos cristais de formazan, 100 microlitros de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550nm, realizada em Leitor de ELISA Dynes Technologies.

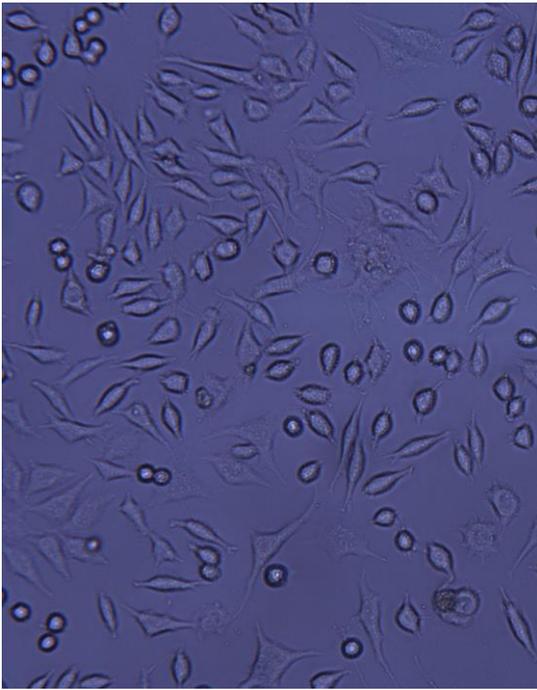


Figura 10: Cultura de fibroblastos (L929).

Fonte: Arquivo pessoal.

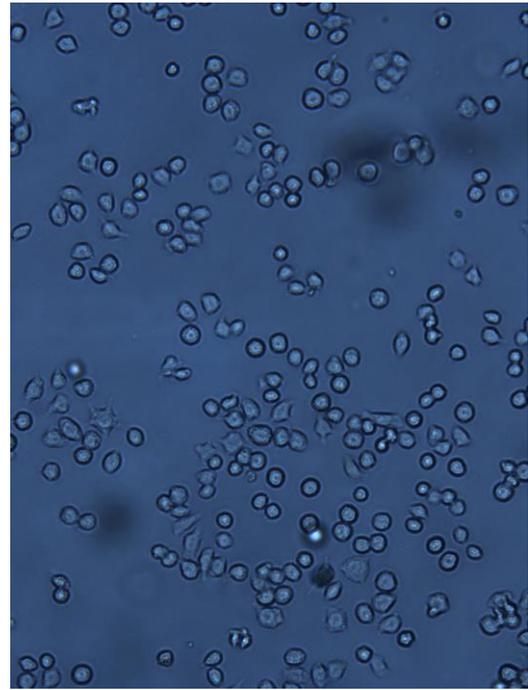


Figura 11: Cultura de macrófagos (J774).

Fonte: Arquivo pessoal.

3.7 Análise estatística

Para análise dos resultados e cálculos matemáticos utilizou-se o programa GraphPad Prism 5, utilizando-se o método One-Way ANOVA com pós teste turkey, com significância de valor de $p < 0,05$, valor de $p < 0,01$, valor de $p < 0,001$. Para o cálculo da IC50 e da CC50, foi utilizado a curva de regressão não linear, utilizando o programa OriginLab 8.5. As concentrações foram transformadas em log para a formação da curva dose resposta.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade leishmanicida dos compostos de bases de Schiff complexados ou não a metais

4.1.1. Atividade *in vitro* do composto A1 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto A1 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160 e 80 $\mu\text{g/mL}$ (figura 12). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* nas concentrações de 40 e 10 $\mu\text{g/mL}$, todas essas com diferenças estatísticas. E na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ o composto A1 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, as promastigotas (figura 12). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto A1 foi de 18,72 $\mu\text{g/mL}$ (figura 13).

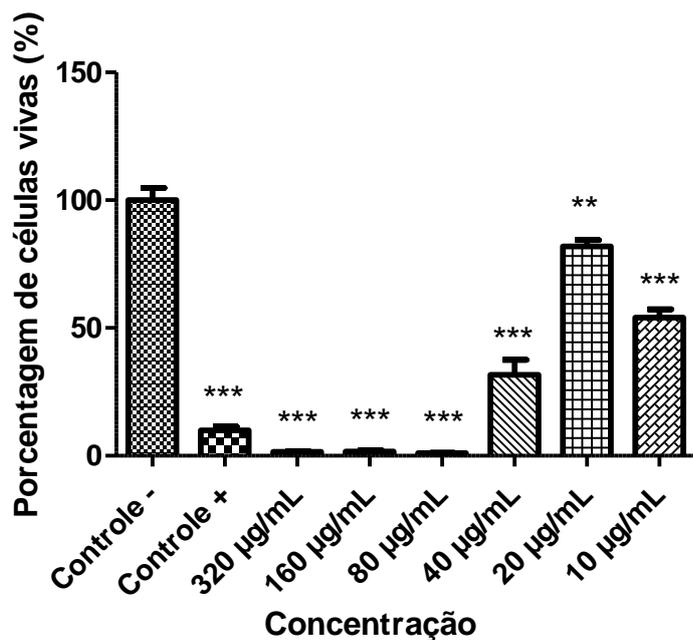


Figura 12: Atividade do composto A1 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos realizados em sextuplicata. O sinal ** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,01$; ***valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B. Como controle negativo foi utilizado somente meio com DMSO.

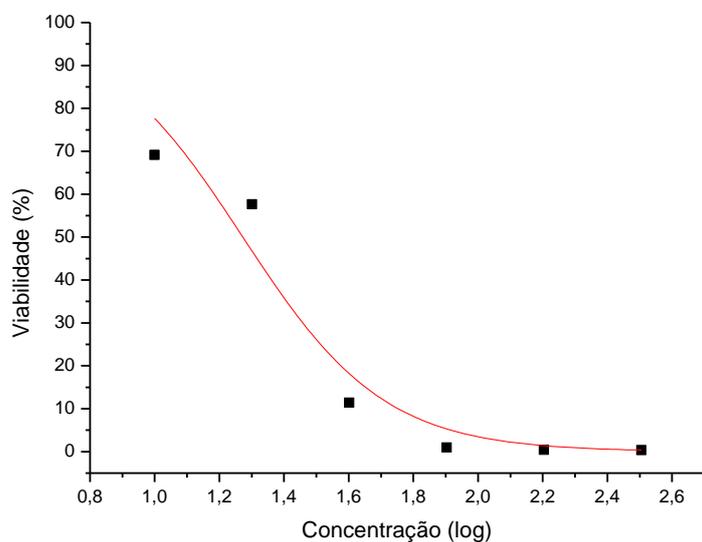


Figura 13: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de A1 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor representativo de um dos experimentos, realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9356$.

4.1.2. Atividade *in vitro* do composto A2 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto A2 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas na concentração de 320 µg/mL (figura 14), e inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* nas concentrações de 160, 80, 40 e 20 µg/mL, todas essas com diferenças estatísticas (figura 14). A concentração de 10 µg/mL não apresentou atividade contra a forma promastigota. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto A2 foi de 31,05 µg/mL (figura 15).

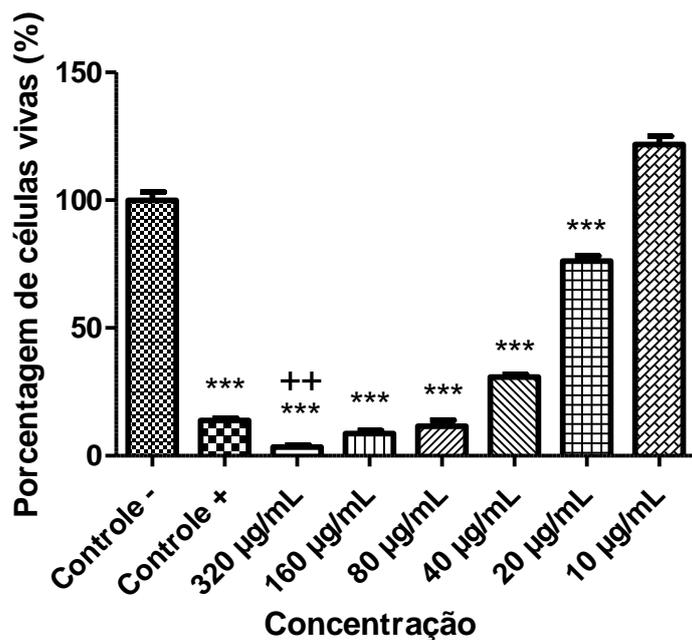


Figura 14: Atividade do composto A2 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$. O sinal ++ indica a concentração que apresentou significância estatística em relação ao controle positivo (anfotericina B).

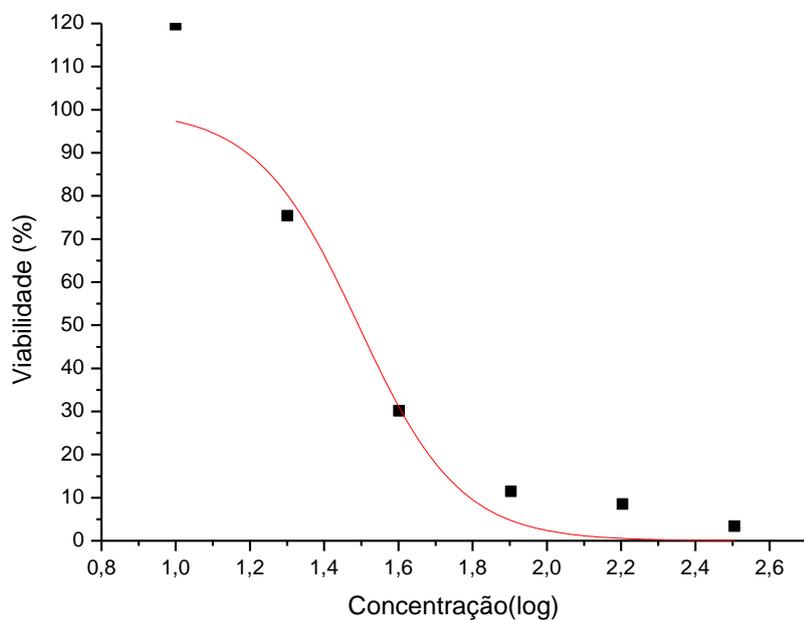


Figura 15: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de A2 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor representativo de um dos experimentos, realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9257$.

4.1.3. Atividade *in vitro* do composto A3 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto A3 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, nas concentrações de 320 e 10 µg/mL, o crescimento das promastigotas (figura 16). As outras concentrações não apresentaram inibição. Não foi possível calcular a IC50 pois a curva não era convergente.

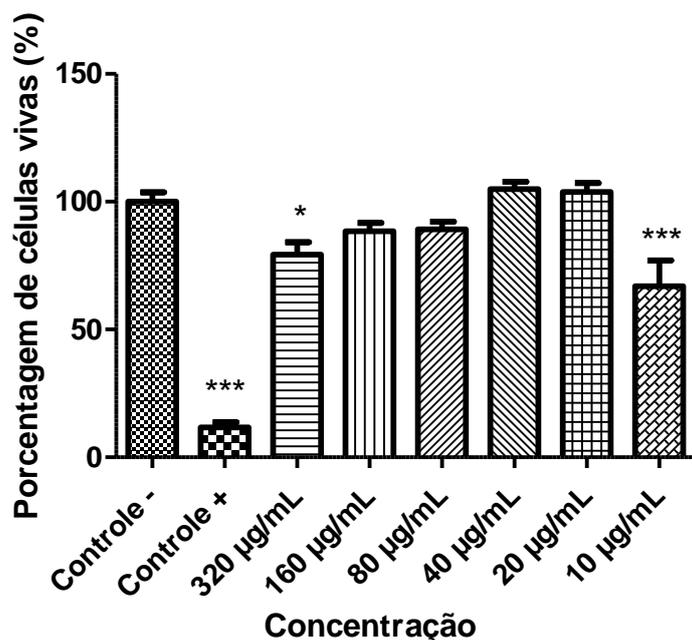


Figura 16: Atividade do composto A3 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,05$; ***valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

4.1.4. Atividade *in vitro* do composto B1 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto B1 inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160 e 80 µg/mL, todas com diferenças estatísticas (figura 17). As demais concentrações testadas não apresentaram inibição das promastigotas. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto A1 foi de 87,02 µg/mL (figura 18).

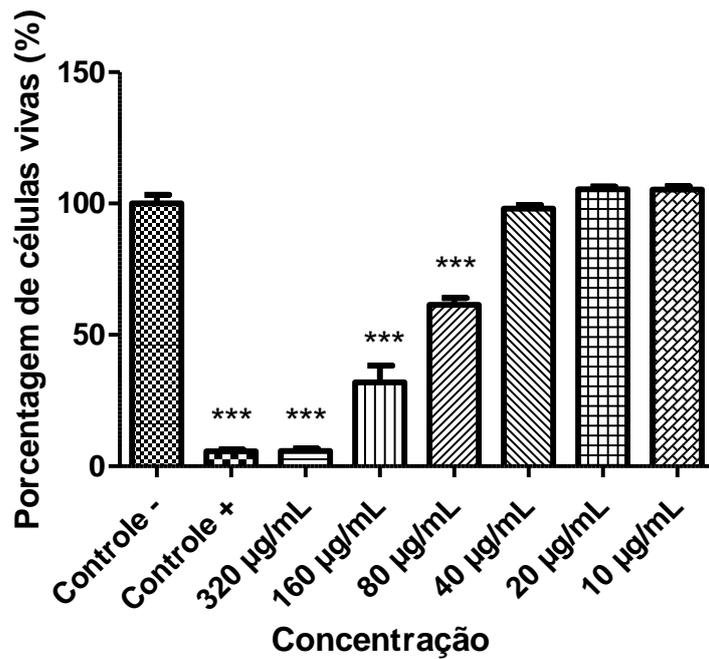


Figura 17: Atividade do composto B1 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

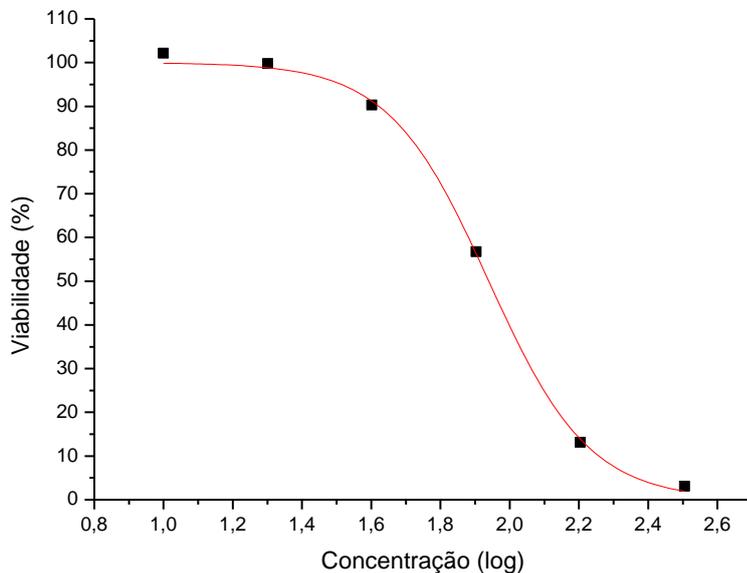


Figura 18: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de B1 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor de $r^2=0,99883$.

4.1.5. Atividade *in vitro* do composto B2 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto B2 inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 10 $\mu\text{g/mL}$, todas essas com diferenças estatísticas (figura 19). E na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ inibiu de forma discreta, porém com diferença estatística, as promastigotas (figura 19). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto B2 foi de 113,69 $\mu\text{g/mL}$ (figura 20).

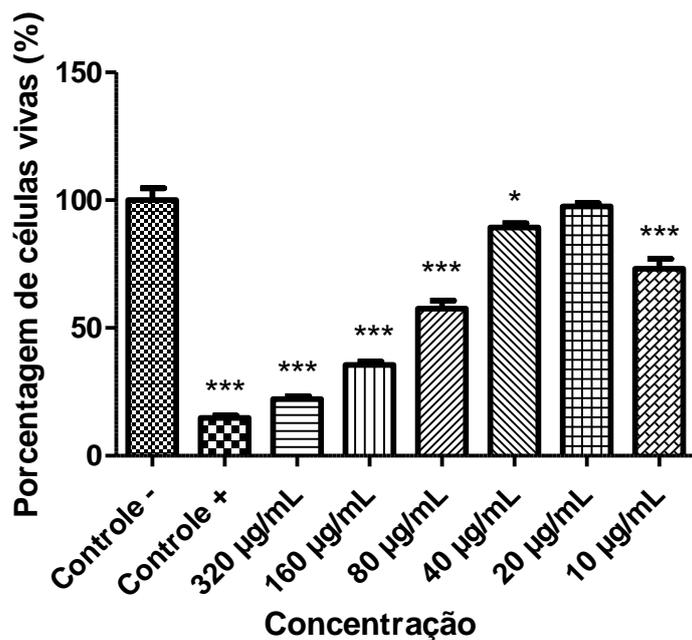


Figura 19: Atividade do composto B2 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,05$; ***valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

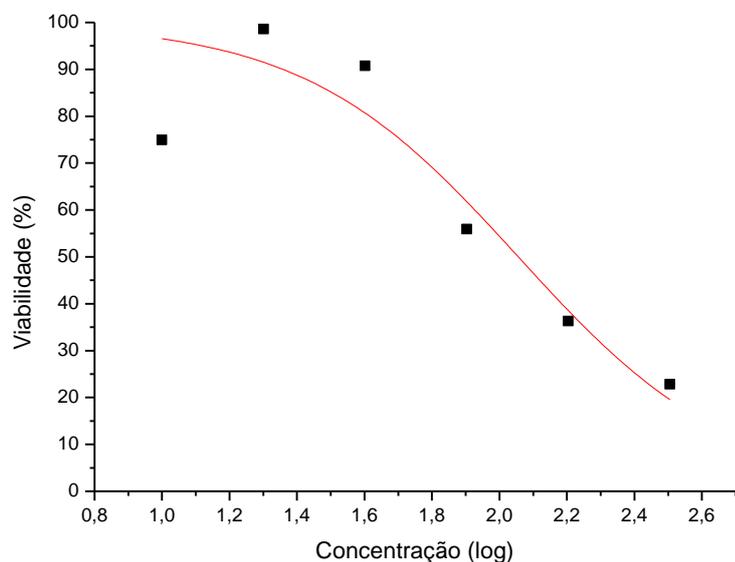


Figura 20: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de B2 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,8164$.

4.1.6. Atividade *in vitro* do composto B3 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto B3 inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 40 µg/mL, todas essas com diferenças estatísticas (figura 21). As demais concentrações não apresentaram inibição das promastigotas. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto B3 foi de 56,18 µg/mL (figura 22).

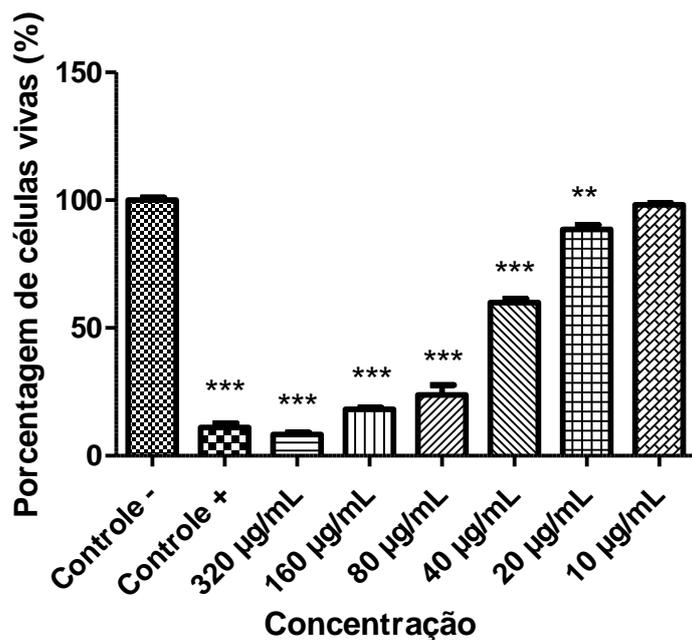


Figura 21: Atividade do composto B3 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

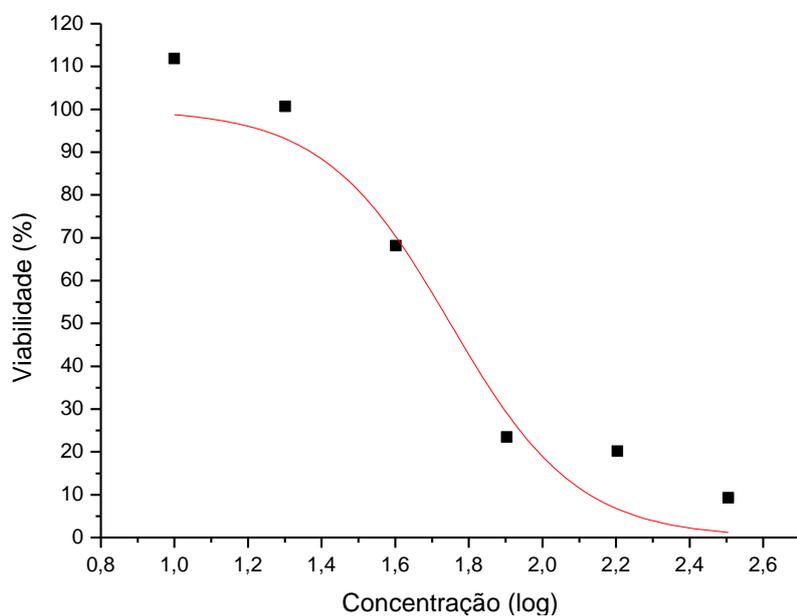


Figura 22: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de B3 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,930$.

4.1.7. Atividade *in vitro* do composto C1 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto C1 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 40 $\mu\text{g/mL}$ (figura 23). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$. E na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ inibiu de forma discreta, todas essas com diferenças estatísticas (figura 23). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto C1 foi de 16,22 $\mu\text{g/mL}$ (figura 24).

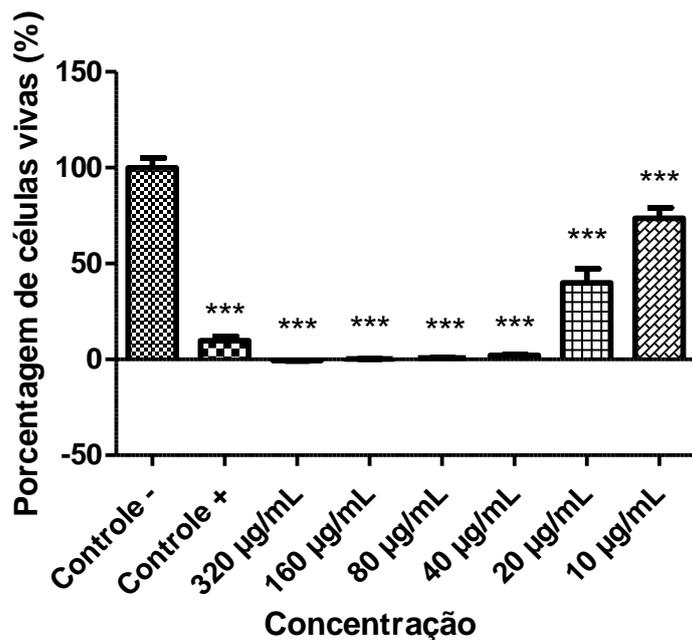


Figura 23: Atividade do composto C1 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,05$; ***valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

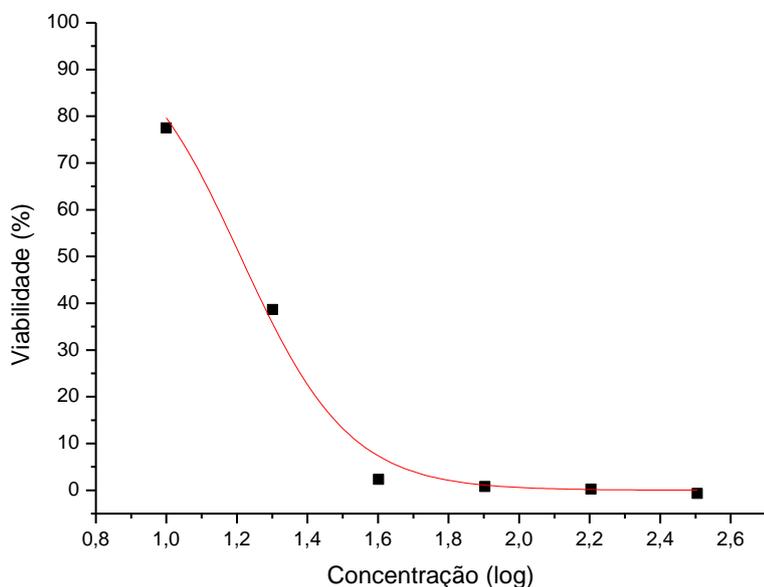


Figura 24: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de C1 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9905$.

4.1.8. Atividade *in vitro* do composto C2 contra promastigota de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto C2 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, o crescimento das promastigotas na concentração de 320 µg/mL (figura 25). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto C2 foi de 538,08 µg/mL (figura 26).

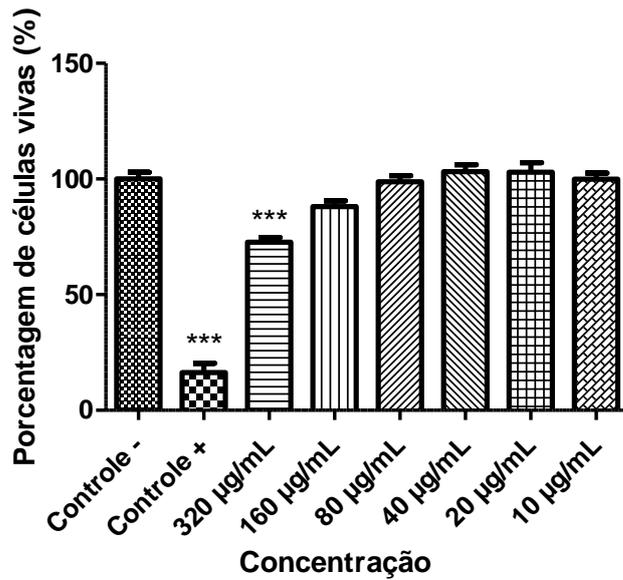


Figura 25: Atividade do composto C2 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B.

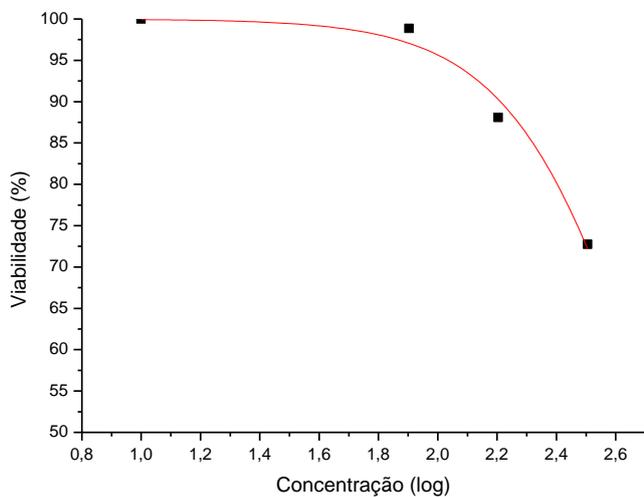


Figura 26: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de C2 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9905$.

5.1.9. Atividade *in vitro* do composto C3 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto C3 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas na concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$ (figura 27). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* nas concentrações de 160, 80, 40, 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$, todas essas com diferenças estatísticas. O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto C3 foi de 28,69 $\mu\text{g/mL}$ (figura 28).

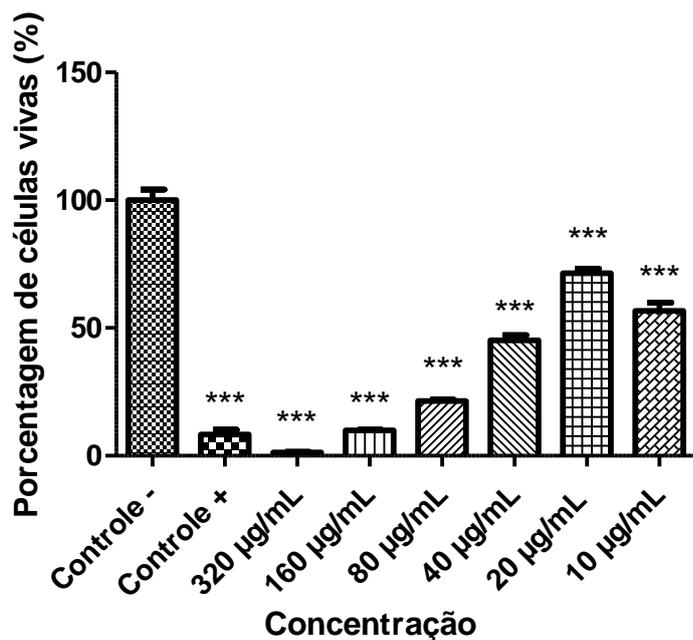


Figura 27: Atividade do composto C3 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizada a anfotericina B

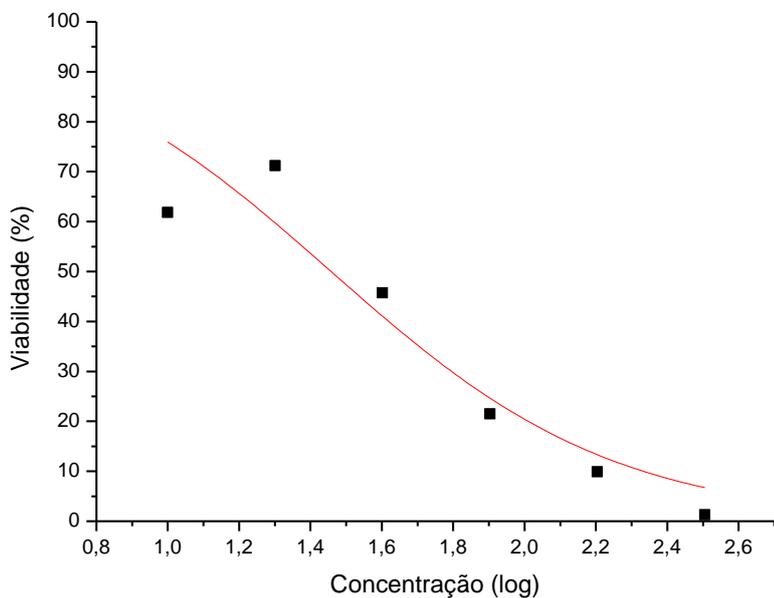


Figura 28: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de C3 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor representativo de um dos experimentos (segundo experimento), realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,8768$.

4.1.10. Atividade *in vitro* do composto D1 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto D1 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 40 $\mu\text{g/mL}$ (figura 29). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, todas essas com diferenças estatísticas. E na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ o composto D1 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, as promastigotas (figura 29). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto D1 foi de 11,80 $\mu\text{g/mL}$ (figura 30).

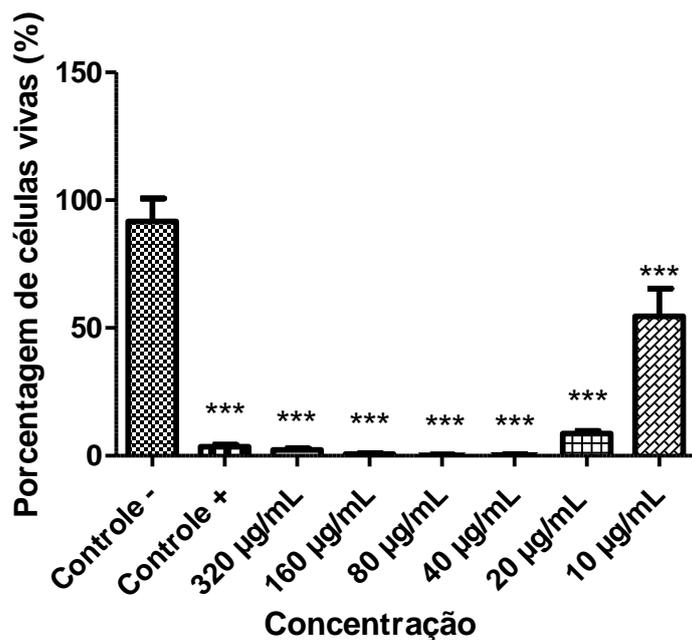


Figura 29: Atividade do composto D1 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle, com valores de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

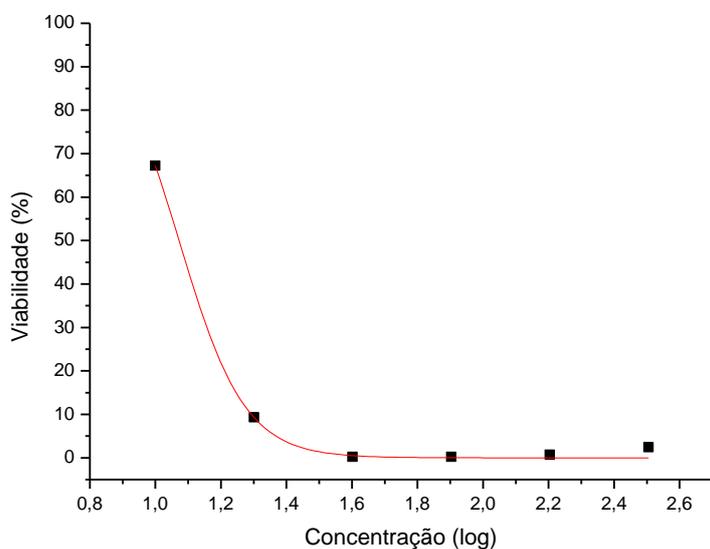


Figura 30: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de D1 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9977$.

4.1.11. Atividade *in vitro* do composto D2 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto D2 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 40 µg/mL (figura 31). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* nas concentrações de 20 e 10 µg/mL, todas essas com diferenças estatísticas (figura 31). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto D2 foi de 12,87 µg/mL (figura 32).

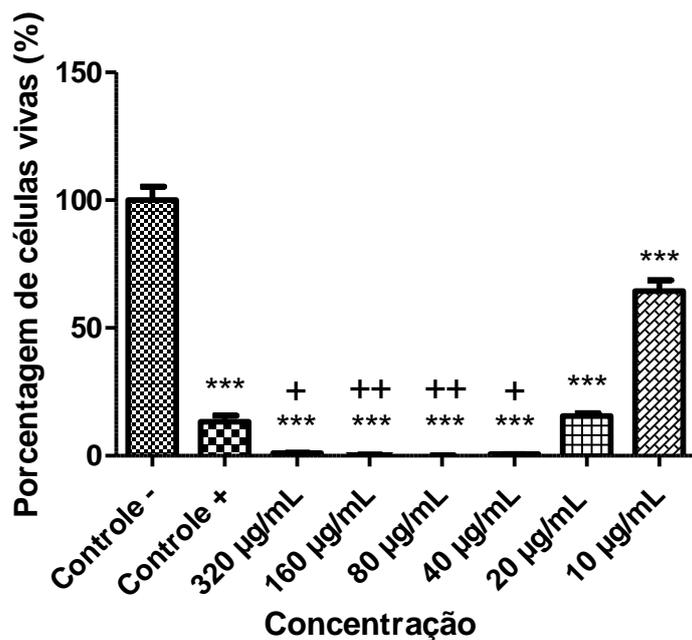


Figura 31: Atividade do composto D2 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$. Os sinais + e ++ indicam as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

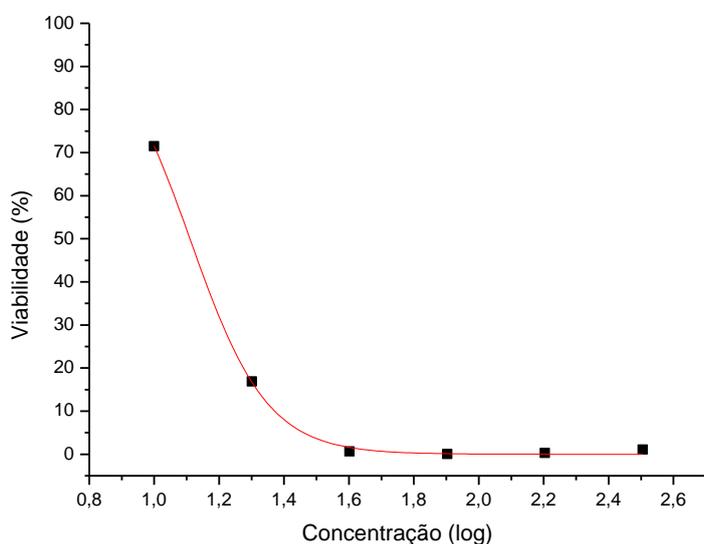


Figura 32: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de D2 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,999$.

4.1.12. Atividade *in vitro* do composto D3 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto D3 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 40 µg/mL (figura 33). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* na concentração de 20 µg/mL, todas essas com diferenças estatísticas. E na concentração de 10 µg/mL o composto D3 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, as promastigotas (figura 33). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto D3 foi de 19,60 µg/mL (figura 34).

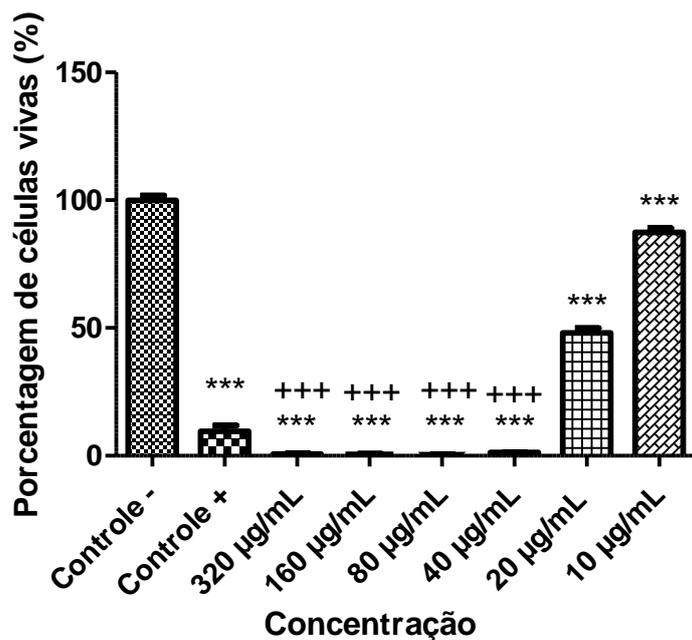


Figura 33: Atividade do composto D3 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$. O sinal +++ indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

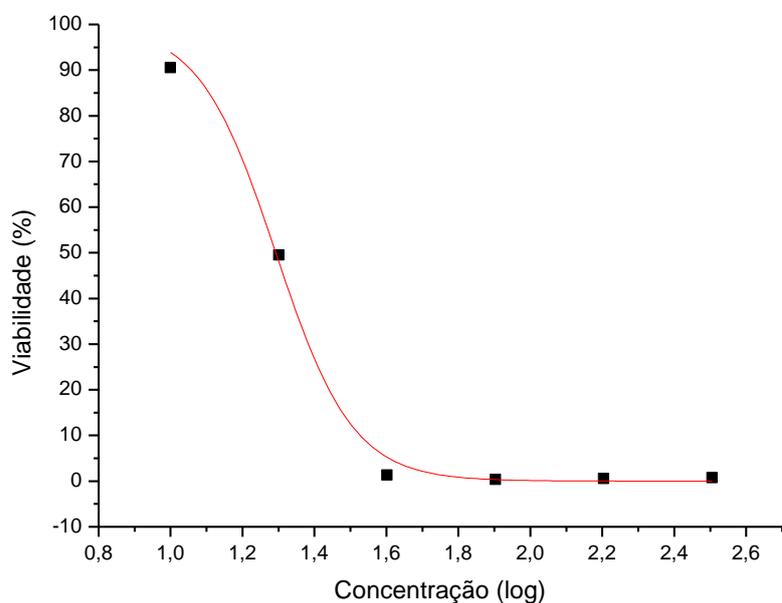


Figura 34: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de D3 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9948$.

4.1.13 Atividade *in vitro* do composto E1 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto E1 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160 e 80 $\mu\text{g/mL}$ (figura 35). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, todas essas com diferenças estatísticas. E na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ o composto E1 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, as promastigotas (figura 35). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto E1 foi de 25,53 $\mu\text{g/mL}$ (figura 36).

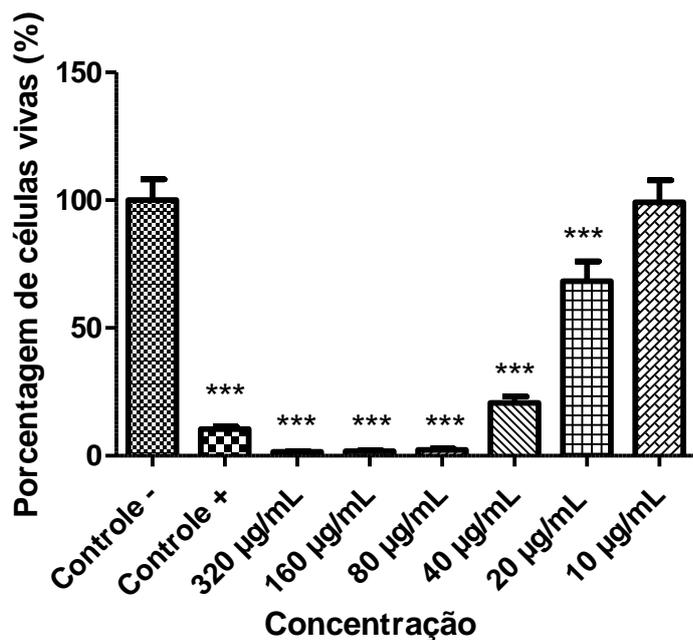


Figura 35: Atividade do composto E1 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

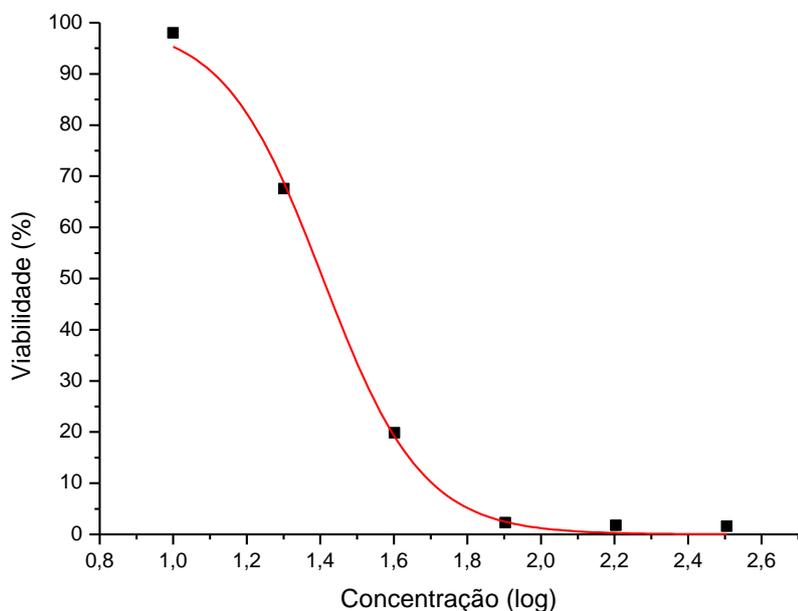


Figura 36: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de E1 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,998$.

4.1.14. Atividade *in vitro* do composto E2 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto E2 inibiu totalmente o crescimento das promastigotas na concentração de 320 µg/mL (figura 37). E inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas de *Leishmania chagasi* nas concentrações de 160, 80, 40 e 20 µg/mL, todas essas com diferenças estatísticas. E na concentração de 10 µg/mL o composto E2 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, as promastigotas (figura 37). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto E2 foi de 45,28 µg/mL (figura 38).

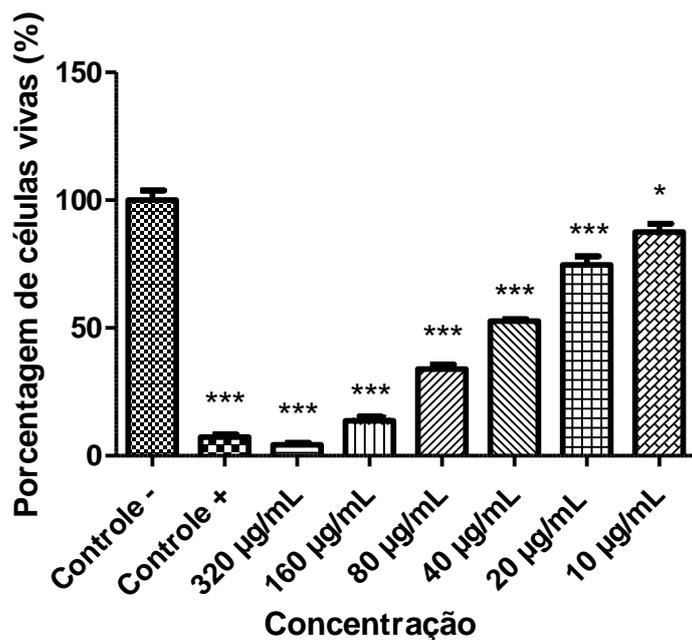


Figura 37: Atividade do composto E2 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal * indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,05$; *** valor de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

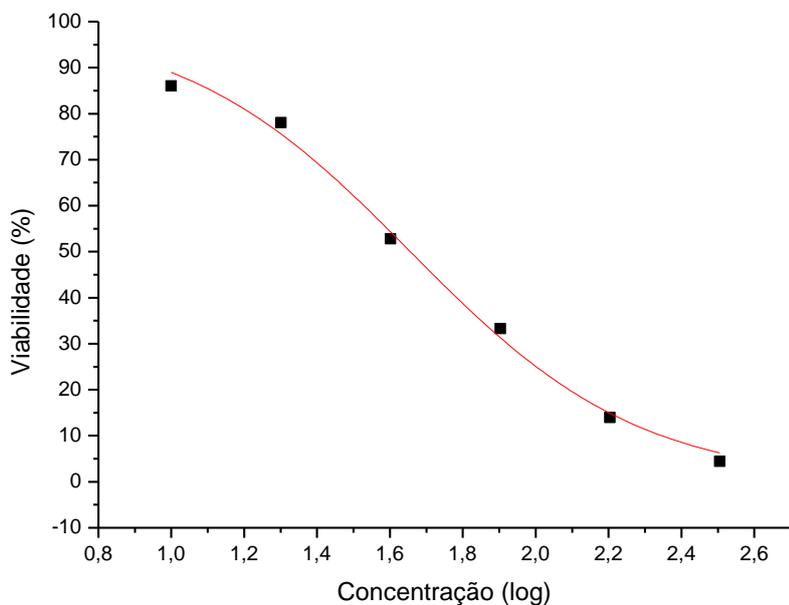


Figura 38: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de E2 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9943$.

4.1.15. Atividade *in vitro* do composto E3 contra promastigotas de *L. chagasi*

Nossos resultados demonstraram que o composto E3 inibiu parcialmente o crescimento das promastigotas nas concentrações de 320, 160, 80 e 40 µg/mL, todas essas com diferenças estatísticas (figura 39). E na concentração de 20 µg/mL o composto E3 inibiu de forma discreta, embora estatisticamente diferente, as promastigotas (figura 39). O cálculo da concentração inibitória de 50% das promastigotas usando o composto E3 foi de 44,47 µg/mL (figura 40).

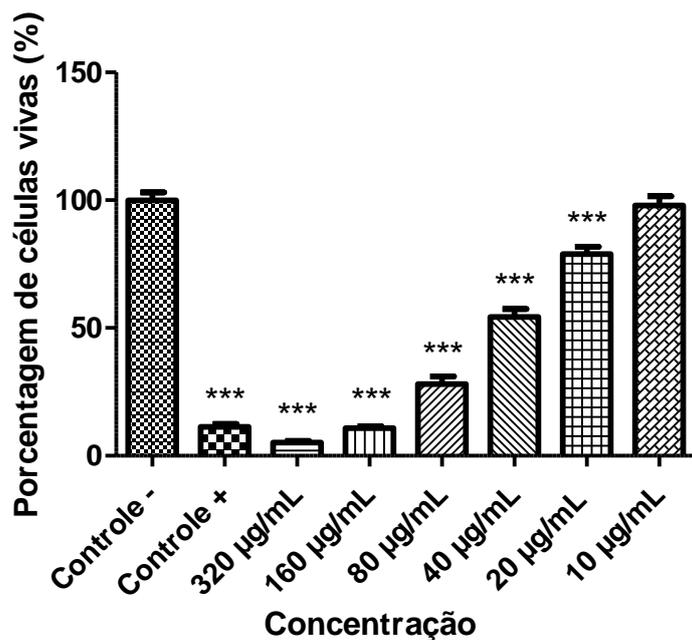


Figura 39: Atividade do composto E3 contra promastigotas de *L. chagasi*, expressa pela porcentagem de células vivas (formas promastigotas), após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em sextuplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B.

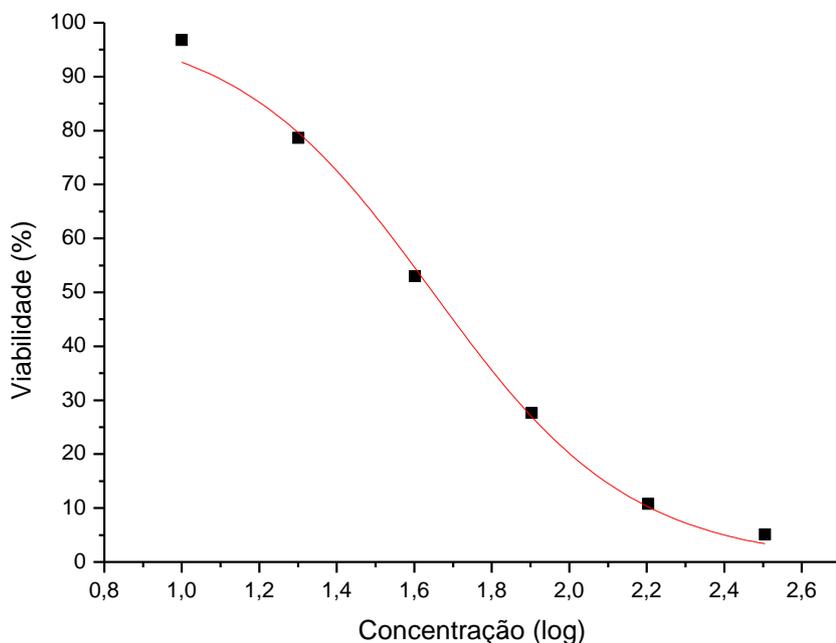


Figura 40: Curva dose-resposta em função do log das concentrações de E3 contra promastigota de *L. chagasi*, em 24 horas. Valor calculado a partir da média dos dois experimentos, cada um realizado em sextuplicata. Valor de $r^2=0,9957$.

4.1.16. Resumo dos valores encontrados para concentração inibitória de 50% das formas promastigotas

A tabela 2 apresenta os valores de IC50 obtidos para os 15 compostos a base de Schiff testado nesse estudo.

Tabela 2. Valor da IC50 dos 15 compostos testados

	Complexo	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
A1	Methoxy + Zn	18,72
A2	N-Salicilidenoanilina + Zn	31,05
A3	P-Nitrosalicilidenoanilina+ Zn	Não calculado
B1	Methoxy+ Ni	87,02
B2	N-Salicilidenoanilina + Ni	113,69
B3	P-Nitrosalicilidenoanilina+ Ni	56,18
C1	Methoxy + Fe	16,22
C2	N-Salicilidenoanilina + Fe	538,08
C3	P-Nitrosalicilidenoanilina + Fe	28,69
D1	Methoxy + Cu	11,8
D2	N-Salicilidenoanilina + Cu	12,87
D3	P-Nitrosalicilidenoanilina + Cu	19,6
E1	Methoxy	25,53
E2	N-Salicilidenoanilina	45,28
E3	P-Nitrosalicilidenoanilina	44,47

4.2. Citotoxicidade dos compostos frente a macrófagos

4.2.1. Atividade *in vitro* do composto A1 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos demonstrou que em todas as concentrações testadas o composto A1 foi tóxico para essas células no tempo de exposição de 24 horas. E demonstrou toxicidade nas concentrações de 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ em 48 horas de exposição (figura 41).

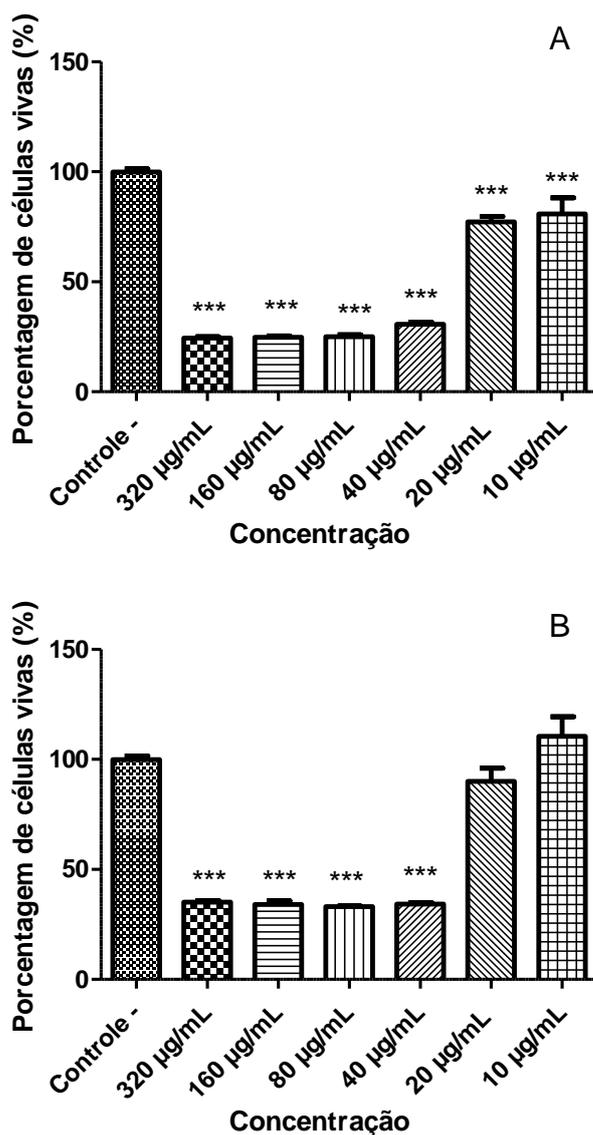


Figura 41: (a) Atividade do composto A1 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, valor de $p < 0,001$.

4.2.2 Atividade *in vitro* do composto A2 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos, em 24 horas de exposição, demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto A2 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Em 48 horas de exposição o composto foi citotóxico em todas as concentrações testadas, exceto na de 20 $\mu\text{g/mL}$ (figura 42).

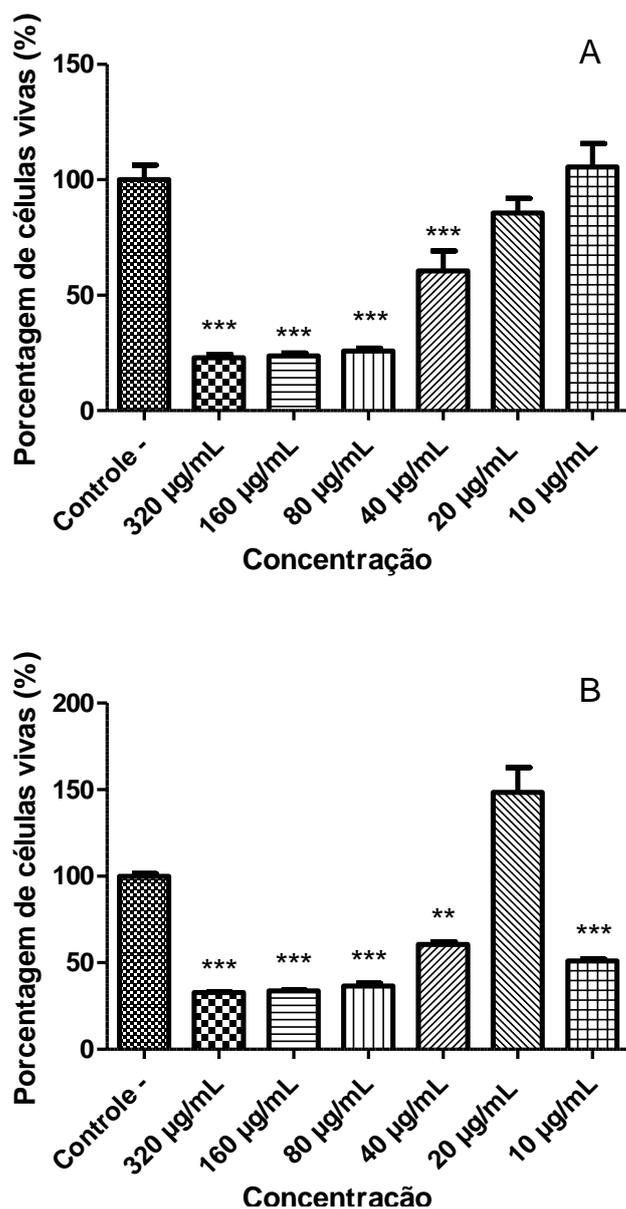


Figura 42: (a) Atividade do composto A2 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$. O sinal ** com valor de $p < 0,01$.

4.2.3. Atividade *in vitro* do composto B3 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos, demonstrou que nas doses 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$ o composto B3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 80 e 10 $\mu\text{g/mL}$, nos dois tempo de exposição (figura 43).

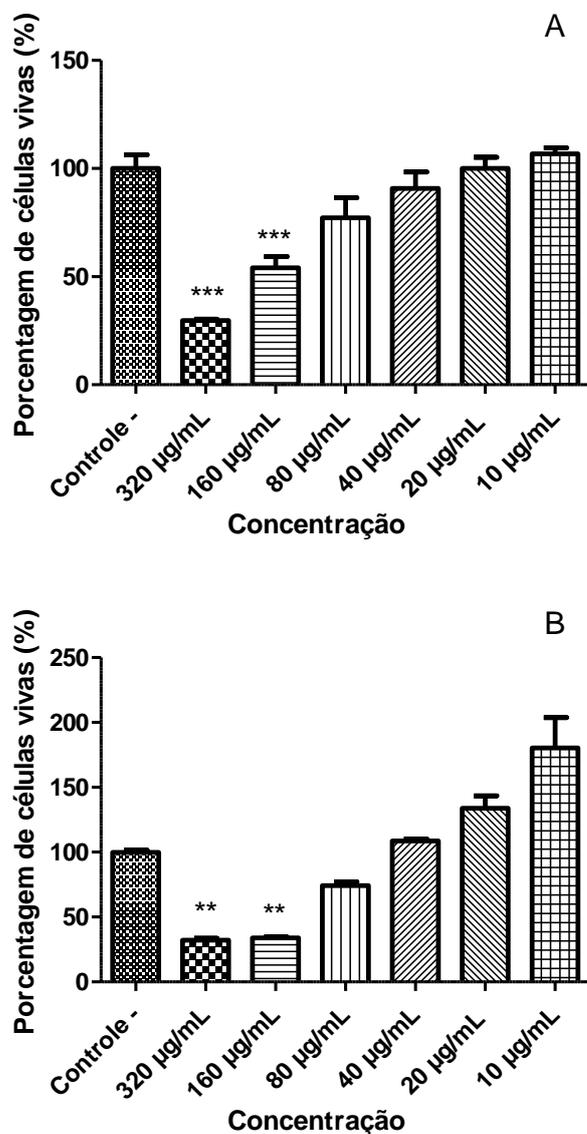


Figura 43: (a) Atividade do composto B3 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$. O sinal ** com valor de $p < 0,01$.

4.2.4. Atividade *in vitro* do composto C1 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos, em 24 horas de exposição, demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto C1 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Em 48 horas de exposição, o composto apresentou citotoxicidade em todas as concentrações testadas (figura 44).

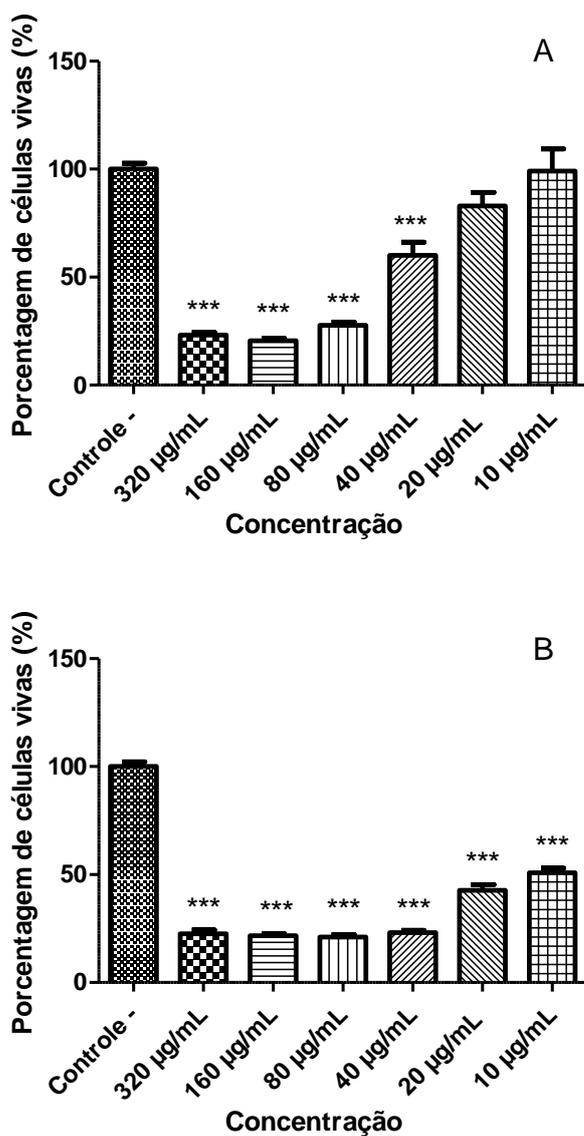


Figura 44: (a) Atividade do composto C1 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, valor de $p < 0,001$.

4.2.5. Atividade *in vitro* do composto C3 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos demonstrou que nas doses 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$ o composto C3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 80 até 10 $\mu\text{g/mL}$, em 24 horas de exposição. Entretanto, com 48 horas de exposição nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade (figura 45).

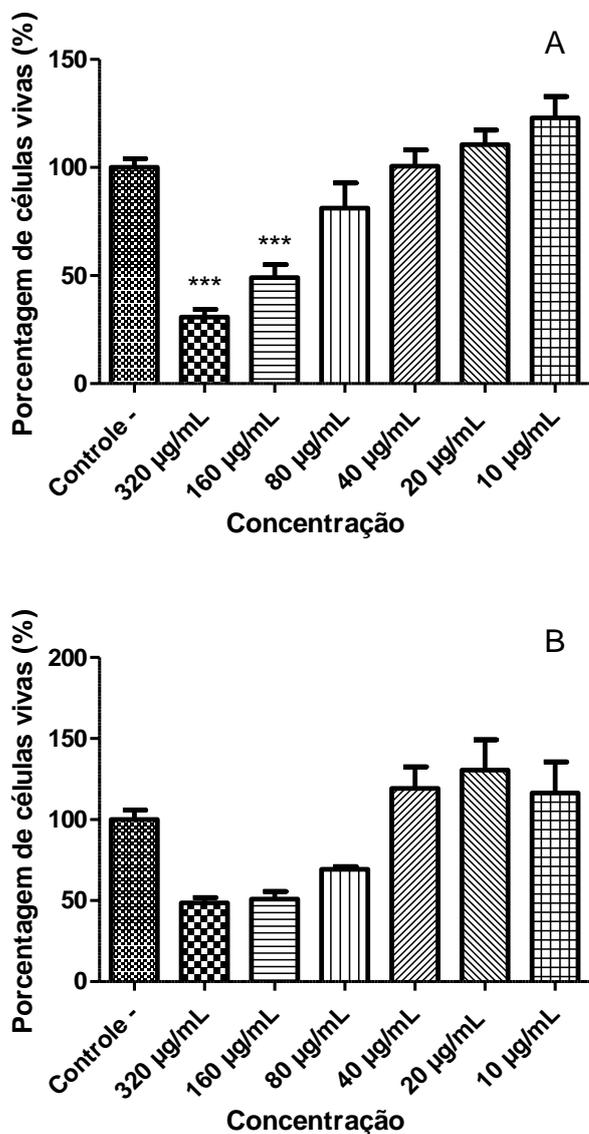


Figura 45: (a) Atividade do composto C3 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$.

4.2.6. Atividade *in vitro* do composto D1 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos, em 24 horas de exposição, demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto D1 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Em 48 horas de exposição, o composto foi citotóxico em todas as concentrações testadas, exceto na de 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 46).

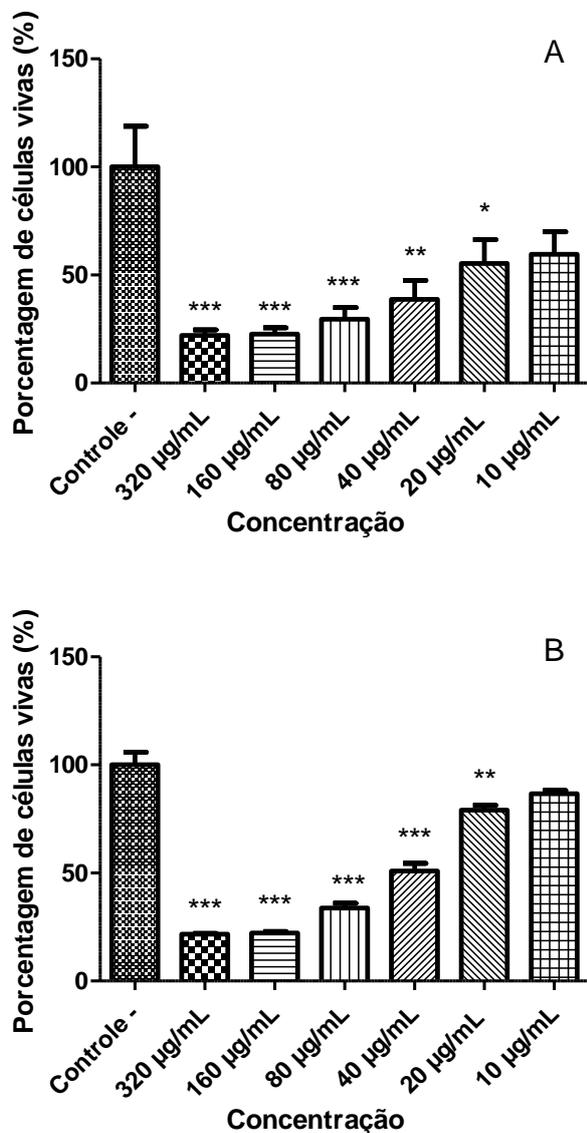


Figura 46: (a) Atividade do composto D1 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle, com valores de $p < 0,001$, ** valor de $p < 0,01$ e * valor de $p < 0,05$.

4.2.7. Atividade *in vitro* do composto D2 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto D2 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$, em 24 horas de exposição. Entretanto, em 48 horas de exposição, o composto apresentou citotoxicidade em todas as concentrações testadas (figura 47).

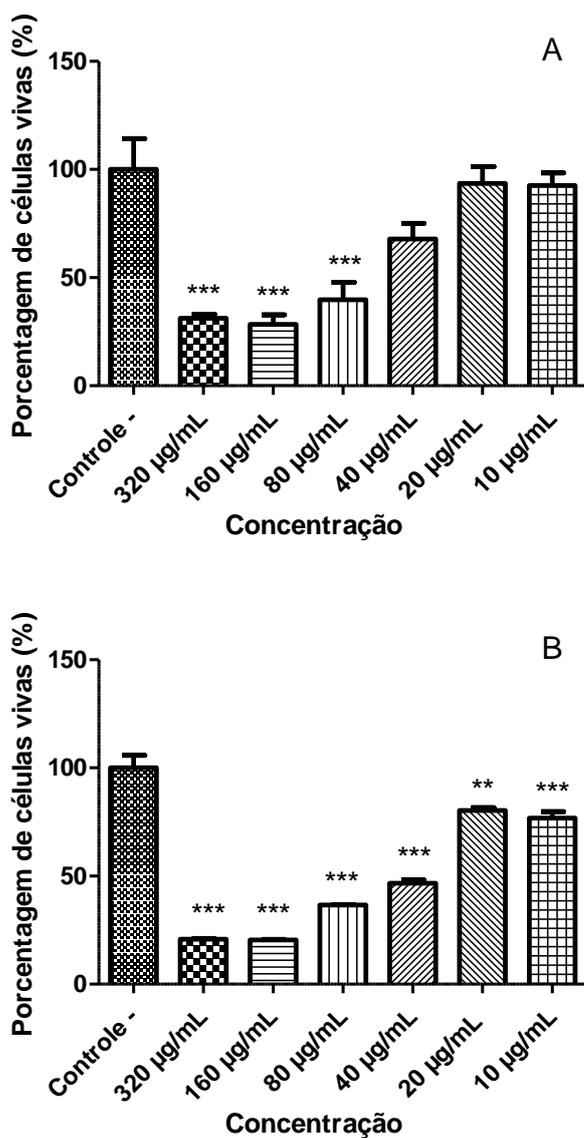


Figura 47: (a) Atividade do composto D2 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, valor de $p < 0,01$.

4.2.8. Atividade *in vitro* do composto D3 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos, nos dois tempos de incubação, demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto D3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 48).

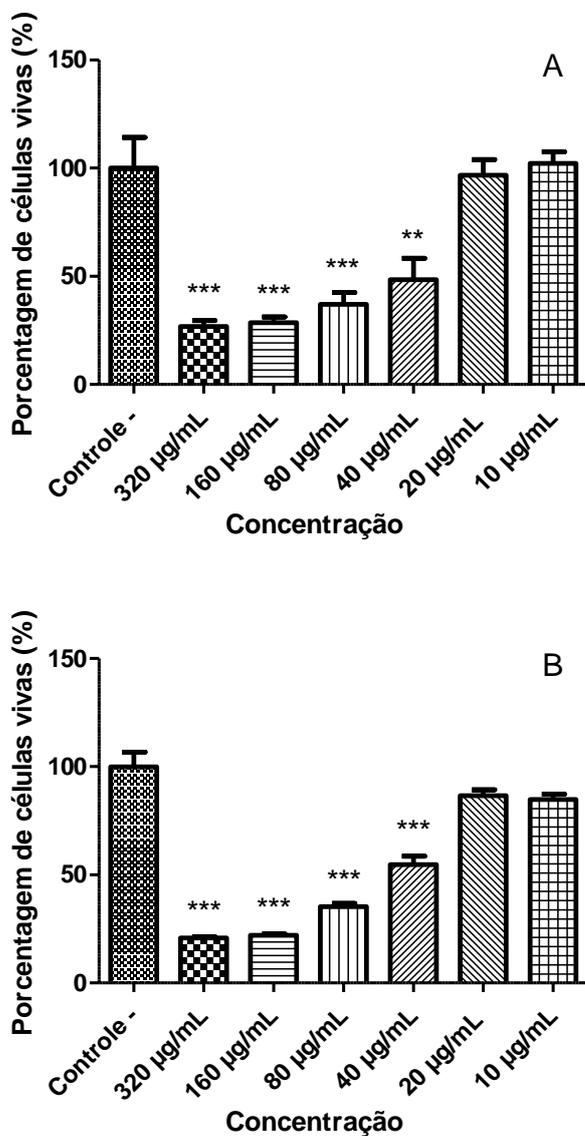


Figura 48: (a) Atividade do composto D3 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, o ** com valor de $p < 0,01$.

4.2.9. Atividade *in vitro* do composto E1 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto E1 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$, nos dois tempos de exposição testados (figura 49).

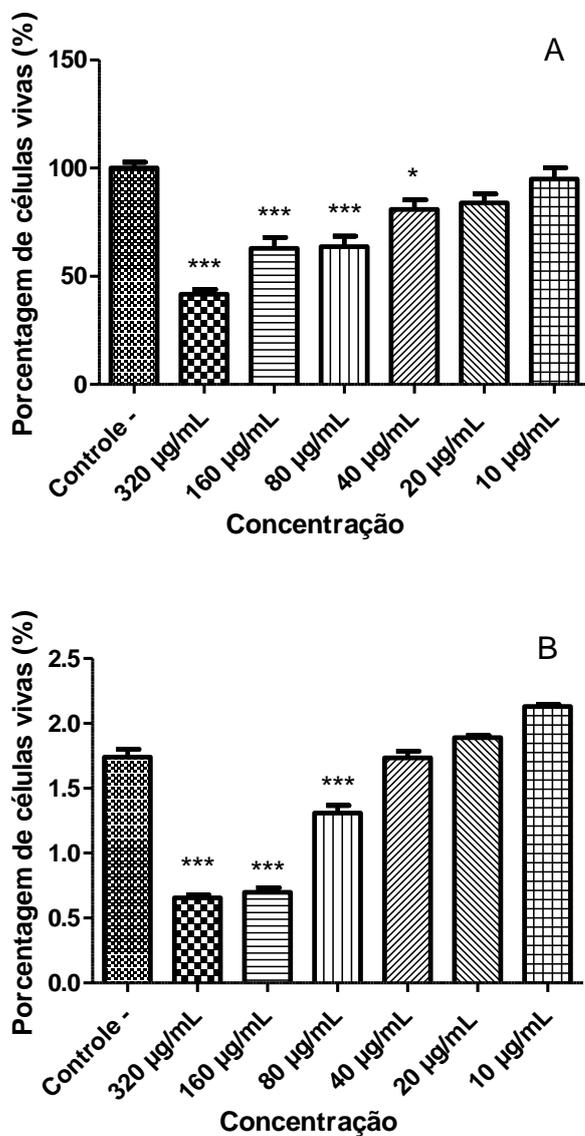


Figura 49: (a) Atividade do composto E1 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os sinais *** e * indicam as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$ e valor de $p < 0,05$, respectivamente.

4.2.10. Atividade *in vitro* do composto E2 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos, nos dois tempos de exposição testados, demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto E2 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 50).

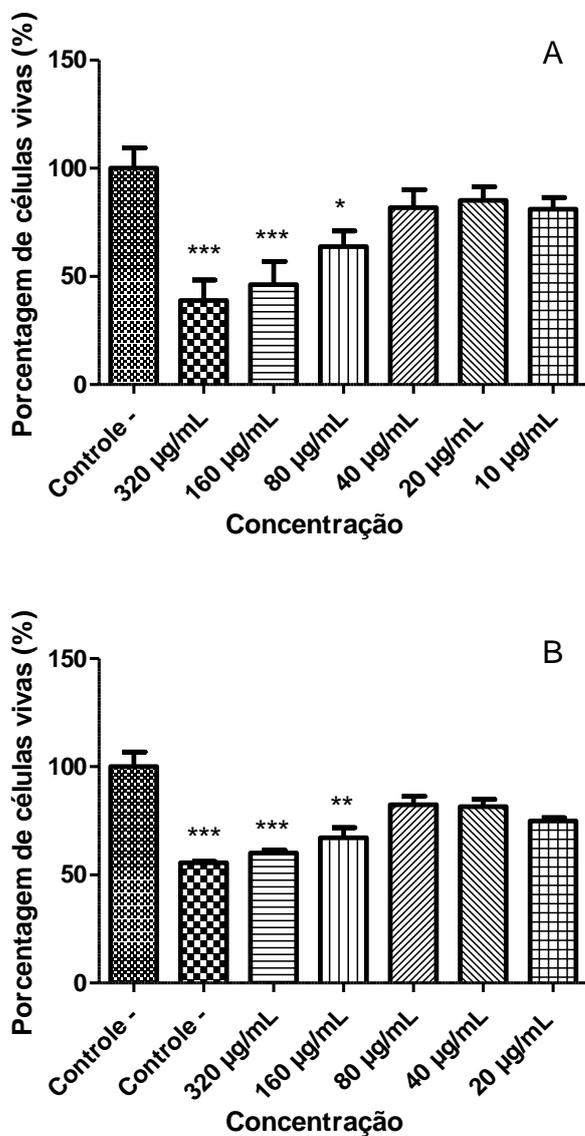


Figura 50: (a) Atividade do composto E2 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, * com valor de $p < 0,05$.

4.2.11. Atividade *in vitro* do composto E3 contra macrófagos (linhagem J774 A1)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos macrófagos demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto E3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$, com 24 horas de exposição. Entretanto, com 48 horas de exposição o composto apresentou citotoxicidade apenas nas concentrações de 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$ (figura 51).

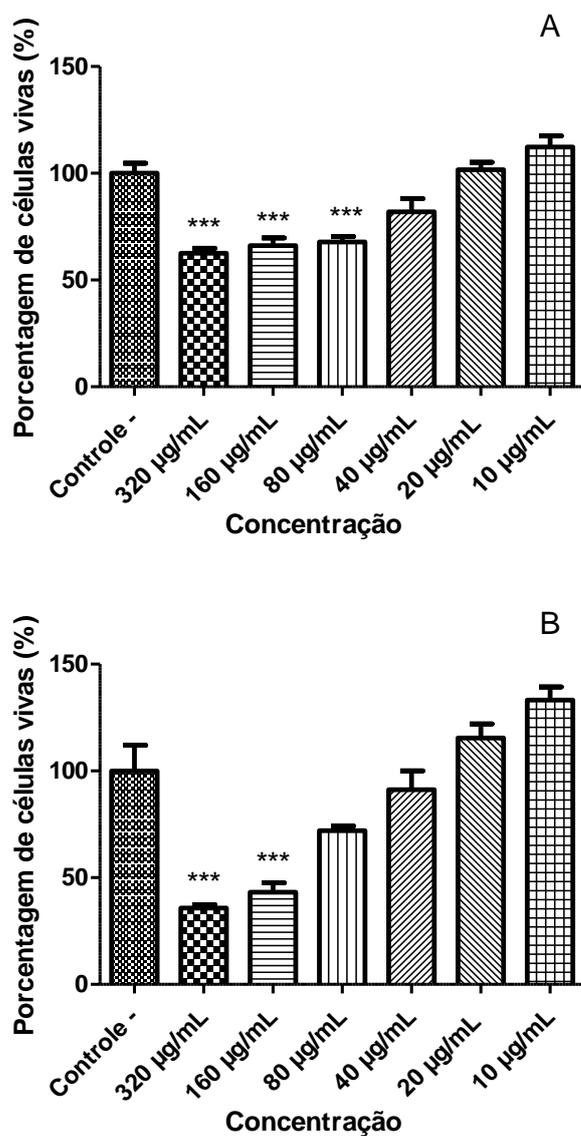


Figura 51: (a) Atividade do composto E3 contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem macrófagos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$.

4.2.12. Valores de CC50 dos compostos contra macrófagos

Tabela 3. Valor da CC50 dos compostos contra macrófagos em 24 e 48 horas de exposição das células com os compostos, e valor da IC50 dos compostos frente as formas promastigotas.

	CC50 ($\mu\text{g/mL}$) 24 horas de exposição	CC50 ($\mu\text{g/mL}$) 48 horas de exposição	IC50 ($\mu\text{g/mL}$) Promastigotas	Índice de seletividade
A1	36,38	62,28	18,72	1,94
A2	58,8	91,9	31,05	1,89
B3	189,72	144,28	56,18	3,37
C1	53,7	7,9	16,22	3,31
C3	174,4	260,36	28,69	6,08
D1	19,92	64,5	11,8	1,69
D2	75,38	61,01	12,87	5,86
D3	40,52	48,34	19,6	2,06
E1	217,46	167,97	25,53	8,51
E2	311,22	601,418	45,28	6,87
E3	437,19	175,41	44,47	9,83

4.3. Citotoxicidade dos compostos frente a fibroblastos

4.3.1. Atividade *in vitro* do composto A1 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto A1 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$, nos dois tempos de exposição testados (figura 52).

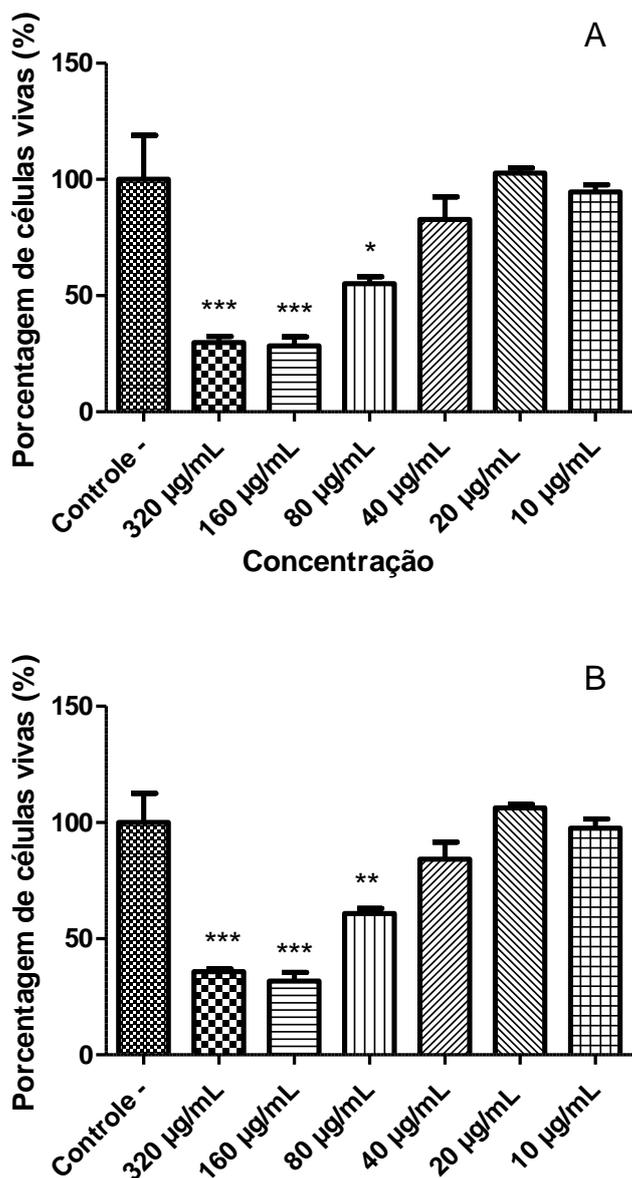


Figura 52: (a) Atividade do composto A1 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, valor de $p < 0,001$, * com valor de $p < 0,05$.

4.3.2 Atividade *in vitro* do composto A2 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos, em 24 horas de exposição, demonstrou que nas doses 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$ o composto A2 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 80 até 10 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, após 48 horas de exposição, o composto apresentou citotoxicidade com 320, 160, 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 53).

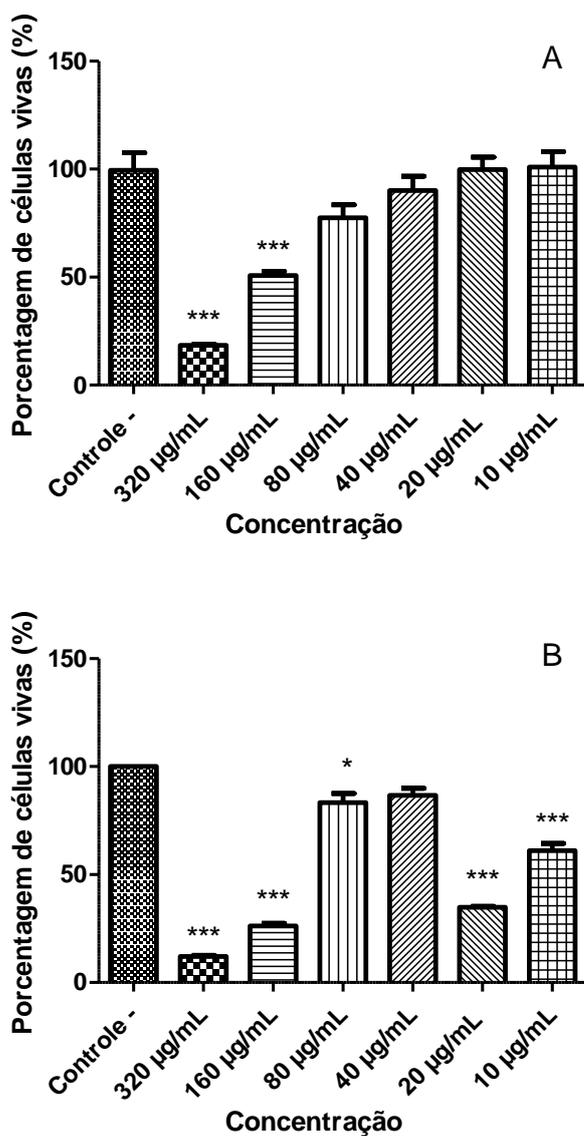


Figura 53: (a) Atividade do composto A2 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$, o sinal * com valor de $p < 0,05$.

4.3.3. Atividade *in vitro* do composto B3 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto B3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$, após 24 horas de exposição. Com 48 horas de exposição, o composto apresentou citotoxicidade em todas concentrações testadas, exceto na de 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 54).

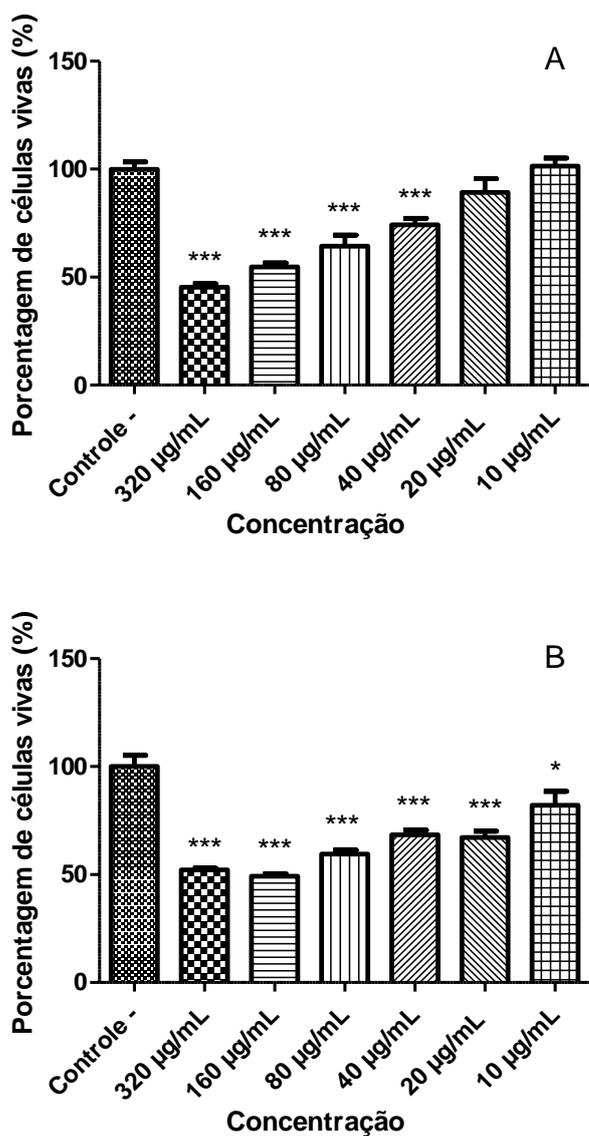


Figura 54: (a) Atividade do composto B3 contra macrófagos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra macrófagos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valor de $p < 0,001$, o sinal * com valor de $p < 0,05$.

4.3.4. Atividade *in vitro* do composto C1 fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos demonstrou que nas doses testadas o composto C1 não foi tóxico para essas células nos dois tempos de exposição testados (figura 55).

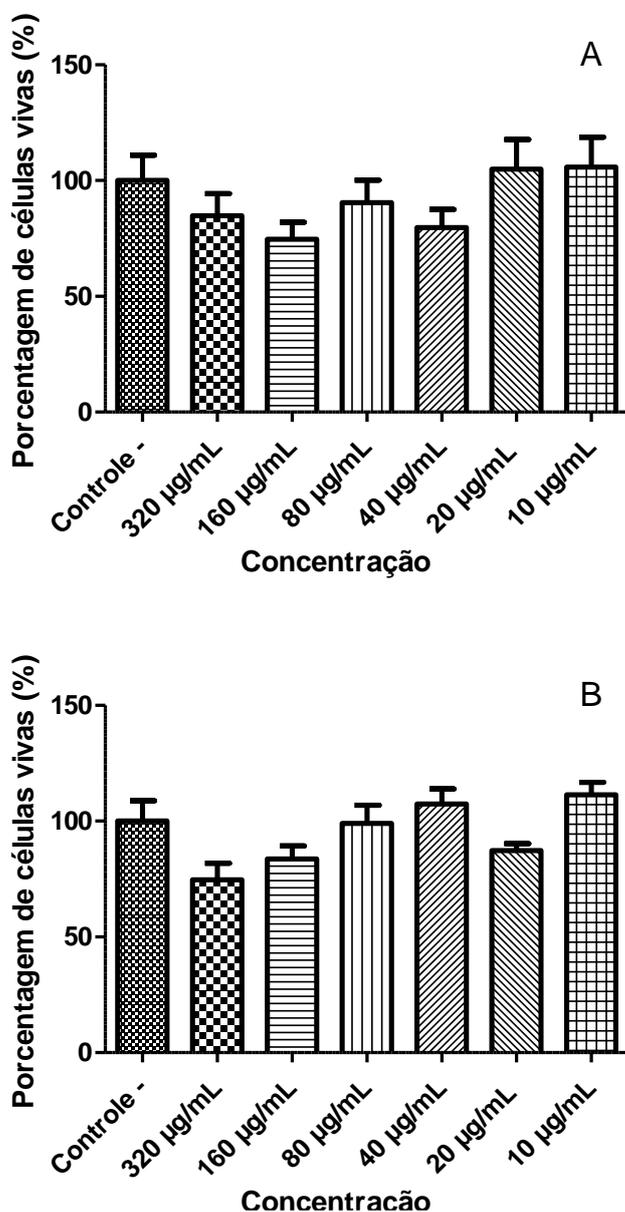


Figura 55: (a) Atividade do composto C1 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3.5. Atividade *in vitro* do composto C3 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto C3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$, em 24 horas de incubação. Após 48 horas de exposição, o composto foi citotóxico apenas nas concentrações de 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$ (figura 56).

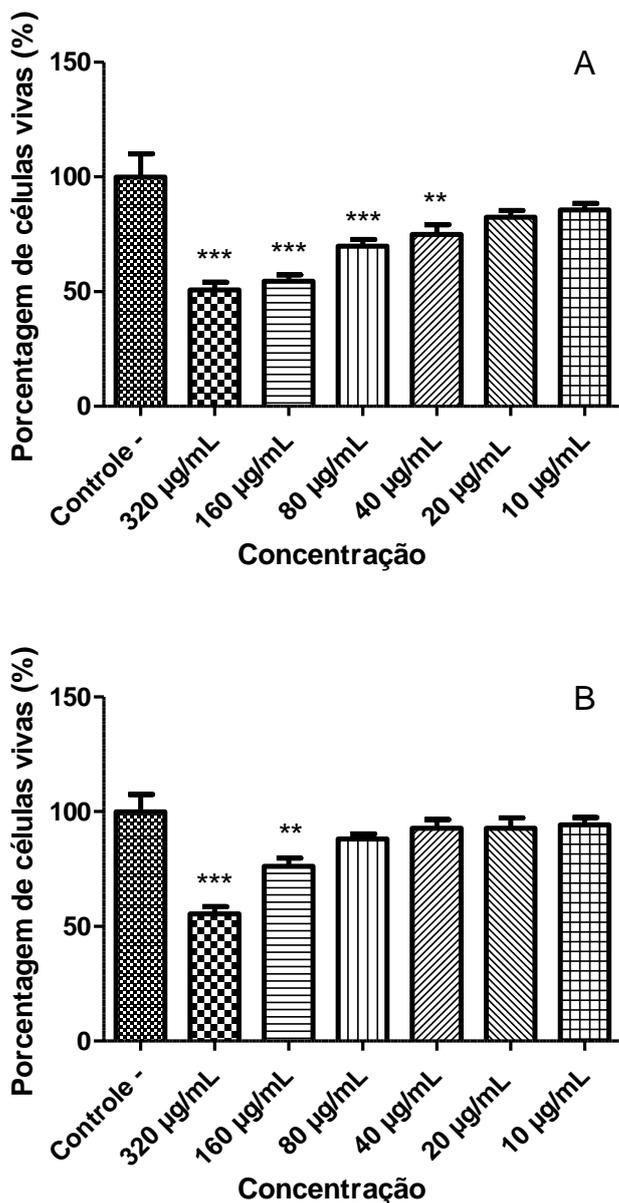


Figura 56: (a) Atividade do composto C3 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, ** com valor de $p < 0,01$.

4.3.6. Atividade *in vitro* do composto D1 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos, após 24 horas de exposição, demonstrou que todas as doses testadas o composto D1 foi tóxico para essas células. Após 48 horas de exposição, este composto apresentou citotoxicidade exceto nas concentrações de 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 57).

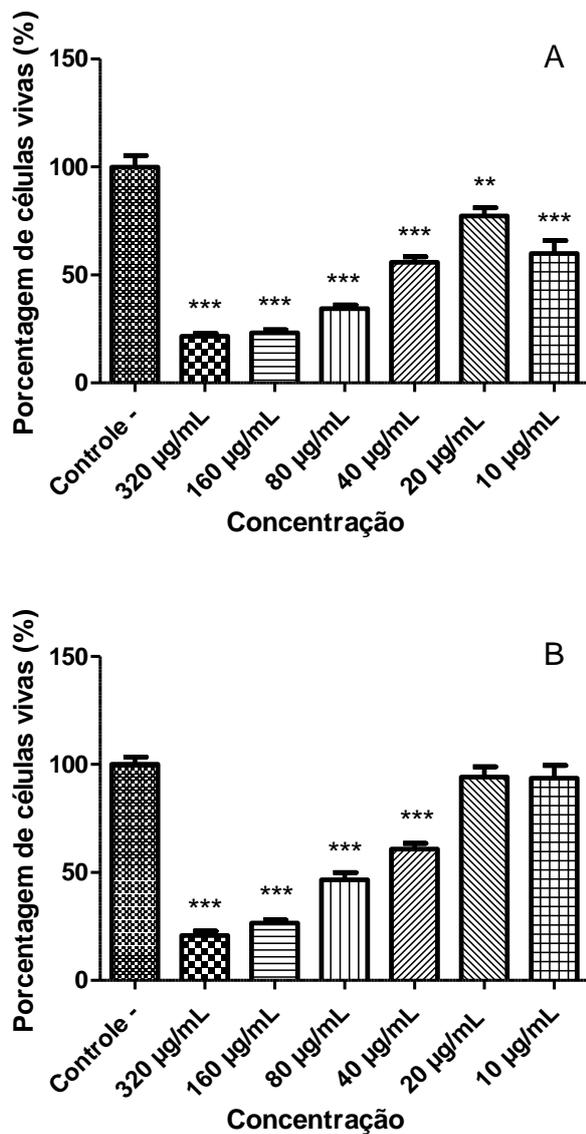


Figura 57: (a) Atividade do composto D1 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao control, com valores de $p < 0,001$ e ** valor de $p < 0,01$.

4.3.7. Atividade *in vitro* do composto D2 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto D2 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$, nos dois tempos de exposição testados (figura 58).

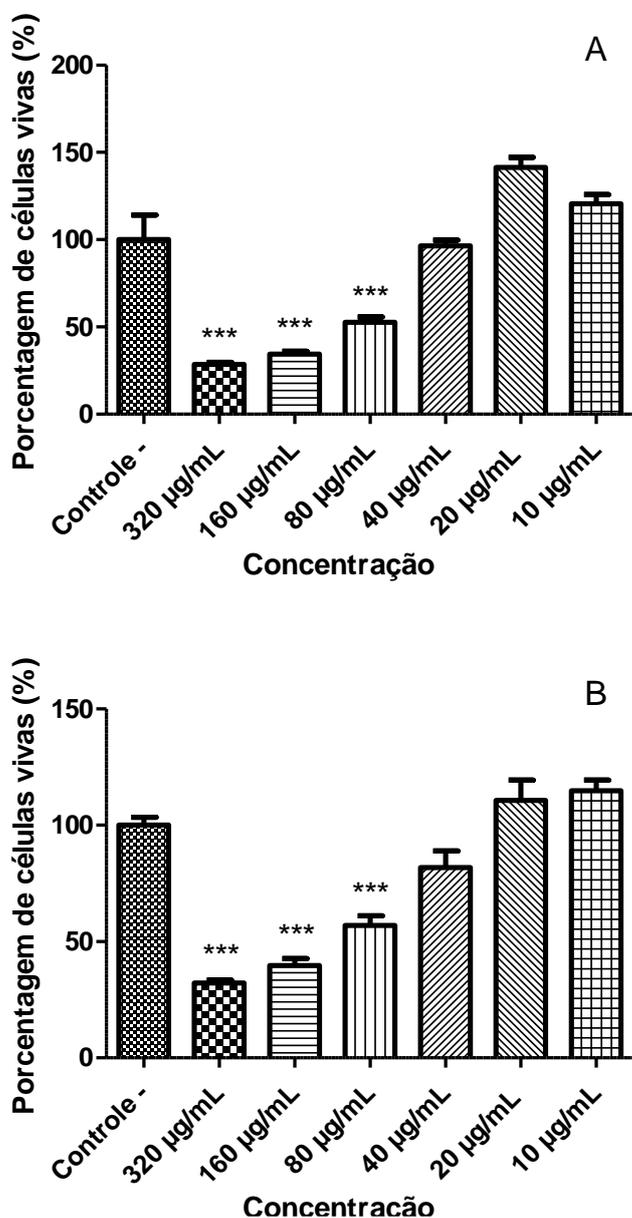


Figura 58: (a) Atividade do composto D2 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$.

4.3.8. Atividade *in vitro* do composto D3 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto D3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$, com 24 horas de incubação. Após 48 horas de exposição, este composto foi citotóxico apenas nas concentrações de 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$ (figura 59).

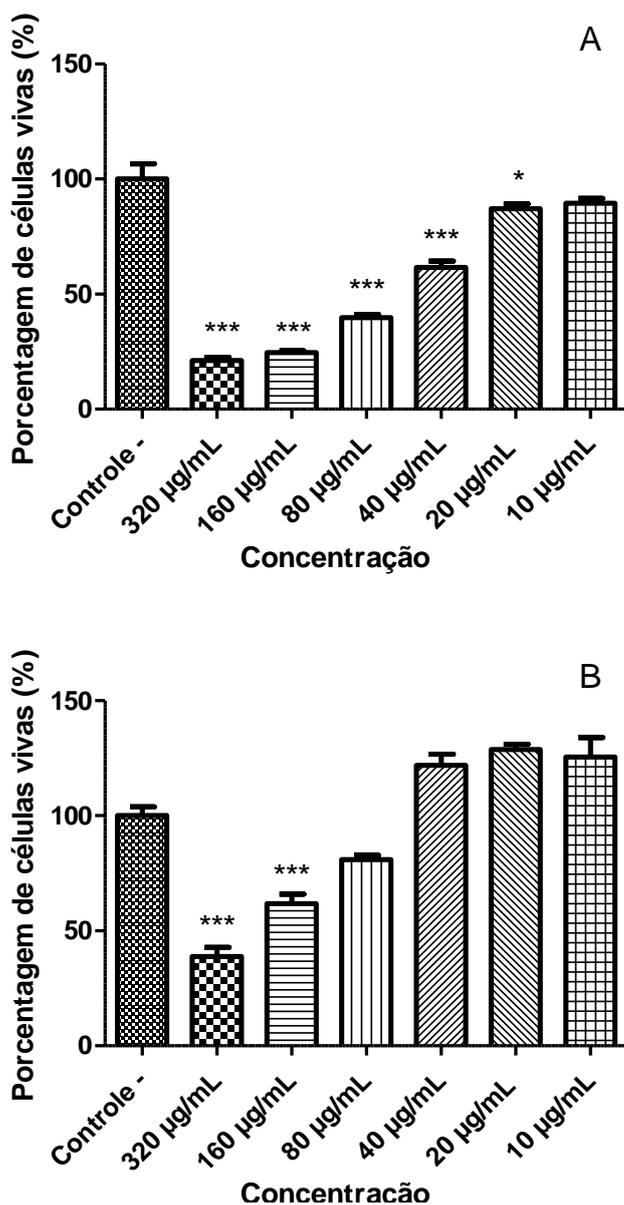


Figura 59: (a) Atividade do composto D3 contra fibroblastos, expressa pelo valor da absorbância, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pelo valor da absorbância, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, o sinal * com valor de $p < 0,05$.

4.3.9. Atividade *in vitro* do composto E1 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos, após 24 horas de exposição, demonstrou que nas doses 320 a 80 $\mu\text{g/mL}$ o composto E1 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 40 até 10 $\mu\text{g/mL}$. Após 48 horas de incubação, este composto apresentou citotoxicidade apenas na concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$ (figura 60).

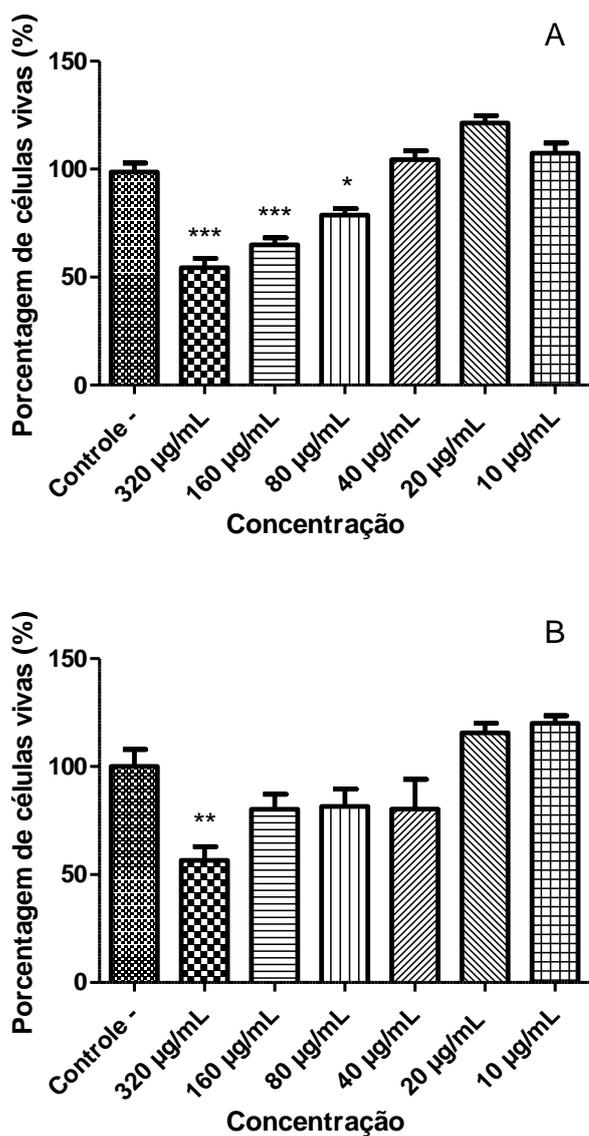


Figura 60: (a) Atividade do composto E1 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, ** com valor de $p < 0,01$, o sinal * com valor de $p < 0,05$.

4.3.10. Atividade *in vitro* do composto E2 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos, com 24 horas de exposição, demonstrou que nas doses 320 a 40 $\mu\text{g/mL}$ o composto E2 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Após 48 horas de incubação, este composto não apresentou citotoxicidade (figura 61).

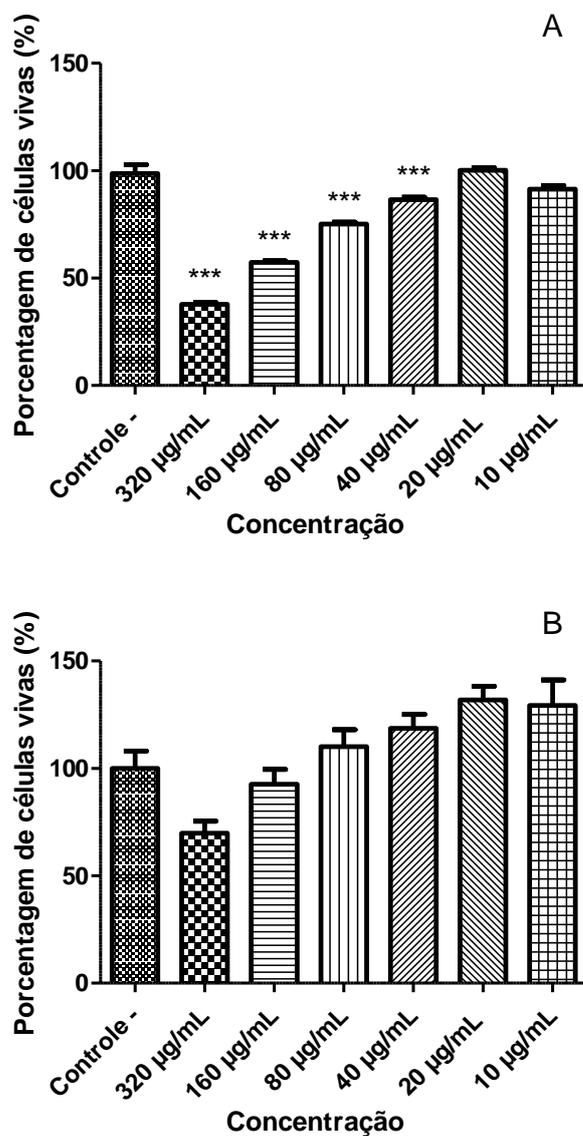


Figura 61: (a) Atividade do composto E2 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$.

4.3.11. Atividade *in vitro* do composto E3 contra fibroblastos (linhagem L929)

A citotoxicidade dos compostos avaliados frente aos fibroblastos, após 24 horas de incubação, demonstrou que nas doses 320 e 160 µg/mL o composto E3 foi tóxico para essas células. E as doses melhores determinadas foram 80 até 10 µg/mL. Após 48 horas de incubação, este composto não apresentou citotoxicidade (figura 62).

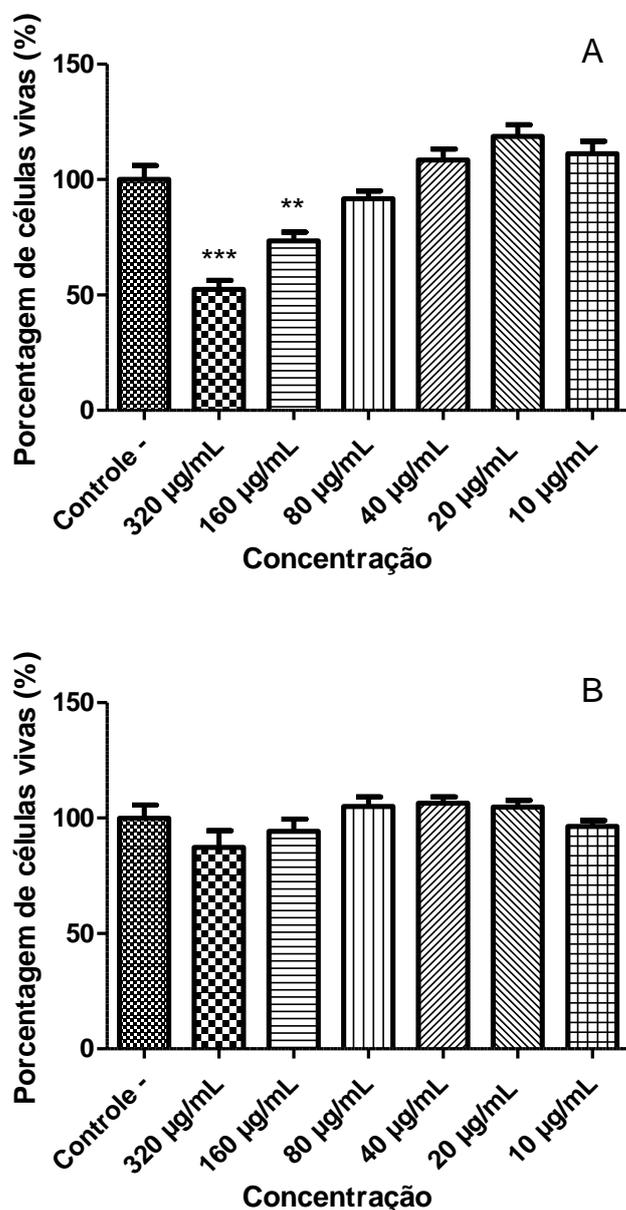


Figura 62: (a) Atividade do composto E3 contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 24 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. (b) Atividade contra fibroblastos, expressa pela porcentagem de fibroblastos viáveis, após 48 horas de exposição às diferentes concentrações do composto. Os valores representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. O sinal *** indica as concentrações que apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo, com valores de $p < 0,001$, ** com valor de $p < 0,01$.

4.3.12. Valores da CC50 dos compostos contra fibroblastos

Tabela 4: Valor da CC50 dos compostos contra fibroblastos em 24 e 48 horas de exposição das células com os compostos e valor da IC50 dos compostos frente as formas promastigotas.

	CC50 ($\mu\text{g/mL}$) 24 horas de exposição	CC50 ($\mu\text{g/mL}$) 48 horas de exposição	IC50 ($\mu\text{g/mL}$) Promastigotas	Índice de Seletividade
A1	101,75	123,68	18,72	5,43
A2	169,57	65,23	31,05	5,46
B3	222,9	Não foi possível	56,18	3,96
C1	Não foi possível	Não foi possível	16,22	--
C3	350,81	557,4	28,69	12,22
D1	43,16	56,12	11,8	3,65
D2	116,16	122,33	12,87	9,02
D3	62,86	258,36	19,6	3,20
E1	446,91	346,93	25,53	17,50
E2	216,44	419,31	45,28	4,78
E3	351,81	Não foi possível	44,47	7,91

5 DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral é uma doença endêmica em várias regiões do mundo. E apesar de algumas alternativas para o tratamento, a eficácia nem sempre é efetiva, e os efeitos colaterais são graves e os custos onerosos. Além disso, não há interesse por parte das indústrias farmacêuticas em investir em pesquisa e desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas, como é o caso da LV (WHO, 2010). Os medicamentos utilizados para o tratamento da LV compreendem o antimoniato pentavalente e a Anfotericina B. Apesar dos antimoniais pentavalentes serem usados como terapia para a LV há mais de 40 anos, ainda assim seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado (VERONESI & FOCACCIA, 1999). Estes podem causar resistência, de acordo com a cepa, além de ser hepatolíticos, nefrotóxicos e cardiotoxicos (AYRES et al., 2007). A Anfotericina B pode causar reações como febre, calafrios e náuseas. Suas formulações lipídicas são de elevado custo, apesar de apresentarem efeitos colaterais mais leves (CROFT & COOMBS, 2003). A miltefosina é a primeira droga oral desenvolvida para o tratamento da LV (CROFT & COOMBS, 2003). Devido aos efeitos colaterais, baixa eficácia e custo destes medicamentos, torna-se imprescindível a busca por novos compostos capazes de findar esses problemas no tratamento da LV. Complexos com metais vem sendo sintetizados e testados para observar sua atividade leishmanicida, como complexos organometálicos contendo platina ou ródio, avaliados contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (MESA-VALLE et al., 1993). Assim, a busca por novas alternativas para o tratamento da LV é de grande valia para a saúde pública.

A espécie de *Leishmania* utilizada nesse trabalho foi a *Leishmania chagasi* etiologia da LV aqui nas Américas, sendo esta forma da doença com alta taxa de letalidade e recidivas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida dos ligantes livre (Bases de Schiff) e de seus complexos com metais de transição. O Methoxy, N e P foram os ligantes de escolha do trabalho, o cobre, zinco, ferro e níquel foram os metais de transição utilizados nos complexos. Testamos 15 compostos, dos quais 11 apresentaram atividades contra promastigotas de *L. chagasi*, com IC50 menores que 70 µg/mL (tabela 2), sendo essa concentração escolhida de forma aleatória.

Nossos resultados demonstraram que, exceto o seu complexo com o níquel (composto B1), todos os outros compostos com o ligante Methoxy apresentaram atividade leishmanicida. O complexo do Methoxy com cobre (composto D1) foi o que mostrou melhor atividade (IC50 de 11,8

$\mu\text{g/mL}$) (figura 29). Dos 3 ligantes livres avaliados, o Methoxy (composto E1) foi o que exibiu melhor atividade e menor IC50 (25,53 $\mu\text{g/mL}$) (figura 36). Os complexos do Methoxy com Zinco (composto A1), Ferro (composto C1) e Cobre (composto D1) apresentaram melhores atividades em relação ao ligante livre (composto E1), sendo o valor da IC50 18,72, 16,22, 11,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (tabela 2). Esses dados corroboram com outros estudos onde o grupo Methoxy foi descrito por terem bons resultados inibitórios quando complexado com derivados de N'-(2-hydroxy-3-Methoxybenzylidene)formohydrazide com o estanho. Neste estudo todos os complexos tiveram melhor atividade leishmanicida (contra *L. major*) quando comparado com os ligantes livres (SHUJAH et al., 2013).

Os complexos de cobre (composto D2) e zinco (composto A2) com a base de schiff N-Salicilidenoanilina (figura 31 e 14) induziram melhores atividades quando comparados com o ligante livre (composto E2) (figura 37). Ademais, o composto A2 na concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$ causou maior inibição das promastigotas quando comparado com a Anfotericina B, com diferença significativa (figura 14). Este composto é um complexo com o zinco, este metal já é utilizado na medicina e na dermatologia (NELDNER et al., 1978). Além de conter relatos de complexos que tiveram atividade como leishmanicida, avaliado *in vitro* contra *L. major* e *L. tropica*, com um efeito melhor do que o antimoniato pentavalente (NAJIM et al., 1998). E ainda já ter sido utilizado como tratamento intralesional para Leishmaniose Cutânea (SHARQUIE & AL-AZZAWI, 1996), além de ter o efeito direto nas leishmanias, e também é sugerido que o zinco tem um efeito imunomodulatório (sobre a respostas dos linfócitos T), efeitos sobre os macrófagos e cicatrização de feridas (SHARQUIE et al., 2001). Assim nossos dados corroboram com esses autores sobre a eficácia do zinco quando presente em algumas formulações contra Leishmania, e possível efeito terapêutico nas leishmanioses.

O complexo de cobre (composto D3) e Ferro (composto C3) com P-Nitrosalicilidenoanilina (figura 33 e 27) apresentaram melhor atividade inibitória quando comparado com o ligante livre (composto E3) (figura 39). Os compostos D2 e D3 nas concentrações de 320, 160, 80, 40 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram melhores atividades leishmanicida (figuras 31 e 33), com diferença significativa, quando comparados com a Anfotericina B. Há alguns estudos, como exemplo em um estudo onde o cobre foi utilizado em diferentes drogas orgânicas para o tratamento de doenças tropicais (NAVARRO et al., 2010). O mecanismo de ação sugerido quando o cobre é complexado a um ligante aromático é a inibição da replicação do DNA, através da interação simultânea de

intercalação e coordenação ao DNA (TAHGHIGHI, 2014). Ainda, condizente com nossos resultados, Navarro e colaboradores (2003) sintetizaram compostos complexados com o cobre, cujo quais em ensaios biológicos mostraram atividades leishmanicida, contra *L. braziliensis* e *L. mexicana in vitro*. Em nosso estudo, os 3 complexos com cobre (compostos D1, D2, D3) apresentaram melhores atividades em comparação aos seus respectivos ligantes livres, com valor de IC50 de 11,8, 12,87, 19,6 µg/mL, respectivamente (figuras 29, 31 e 33). Contudo, estes compostos apresentaram alta toxicidade contra macrófagos e fibroblastos, sugerindo que, esses compostos não são indicados para o tratamento da LV.

O composto B3 apresentou boa atividade contra as promastigotas, com valor de IC50 de 56,18 µg/mL (figura 21) e baixo efeito citotóxicos tanto em macrófagos (figura 43) quanto em fibroblastos (figura 54) nos dois períodos de tempo testados. Um estudo promissor sintetizou 4,6-dimethyl-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7-dione e diferentes aminas complexando-as com níquel e estes complexos foram testados contra *L. chagasi* e *L. braziliensis* (RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012). Sendo que os valores da IC50 de dois destes complexos foram menores do que a droga de referência utilizada (antimoniato pentavalente), além da diminuição da taxa de infecção de macrófagos pelas promastigotas com o uso destes complexos (RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012). Ainda, o mecanismo de ação em promastigotas proposto foi o de alterar o metabolismo de energia do parasita e membranas de organelas, levando a vacuolização, degradação e morte celular (RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012). Sugerindo assim, que em nosso modelo esses efeitos sejam ampliados pelo composto estar complexado aos metais.

O composto C3, complexo com ferro, apresentou boa atividade leishmanicida (com valor de IC50 28,69 µg/mL), e baixa toxicidade contra macrófagos (figura 45) e fibroblastos (figura 56) nos dois tempos testados. Enquanto o composto C1 apesar de ter apresentado boa atividade de inibição das promastigotas, e baixa citotoxicidade contra fibroblastos (figura 55), apresentou alta toxicidade contra macrófagos (figura 44), principalmente com 48 horas de exposição do composto (tabela 3).

Em seu estudo com complexos de bases de Schiff e metais (4(4-(dimethylamino)benzylideneaminoMn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn), os complexos com estes metais apresentaram resultados melhores comparados aos ligantes livres contra *L. major*, *L. tropica* e *L. donovani* (KHAN et al., 2013). Assim, a utilização de metais associados ou não a compostos químicos tem apresentado resultados promissores frente a busca de novos fármacos para o tratamento da LV.

Os compostos A3 (figura 16), C2 (figura 25), B1 (figura 17) e B2 (figura 19) apresentaram resultados não satisfatórios para a inibição, não sendo possível calcular o valor do IC50. Neste primeiro composto (A3) por não ser possível realizar a curva de regressão não linear no gráfico, isto devido à baixa variabilidade das concentrações avaliadas, sendo esses complexos não adequados para continuidade desse estudo.

Dos 15 compostos iniciais foram selecionados os 11 que apresentaram melhor atividade leishmanicida para a realização do ensaio de citotoxicidade, sendo estes avaliados nas atividades frente a fibroblastos e macrófagos. Os compostos E1, E2, E3, B3 e C3 apresentaram poucos efeitos citotóxicos em 24 e 48 horas nos macrófagos (tabela 3). E os compostos A2, B3, C1, C3, D3, E1, E2, E3 baixo efeitos citotóxicos em fibroblastos com 24 e 48 horas de exposição de cada composto. Todos os compostos apresentaram maior citotoxicidade em macrófago quando comparados com os fibroblastos. Portanto, para um composto ser promissor para o tratamento da LV, ele precisa ser citotóxico para as leishmanias, mas não ser citotóxico para macrófagos e fibroblastos simultaneamente, devido essas células serem fundamentais no processo inflamatório para contenção do patógeno e também para reparo tecidual após lesões de diferentes origens, respectivamente.

Os compostos D1, A1, D3, C1 e A2 foram os que apresentaram pior efeitos citotóxicos em macrófagos, com valor de IC50 menor que 60 µg/mL com tempo de exposição de 24 horas. Todos os 11 compostos testados nos ensaios de citotoxicidade tiveram valor de IC50 menores contra as promastigotas quando comparadas com os valores de IC50 dos ensaios citotóxicos, isto é, apresentaram maiores efeitos citotóxicos frente as promastigotas em comparação com os outros dois tipos celulares testados (macrófagos e fibroblastos). Uesugi e colaboradores (2012) verificaram que nano-complexos com zinco não apresentaram citotoxicidade frente a fibroblastos, no entanto esses dados discordam parcialmente dos nossos resultados.

Os complexos com o metal cobre (compostos D1, D2 e D3) foram os que apresentaram maior citotoxicidade, tanto em macrófagos, quanto em fibroblastos. Diferentemente disto, Bolos e colaboradores (2002) ao testarem complexos com cobre averiguaram uma baixa toxicidade em fibroblastos, e alta em células cancerígenas de colón. Arena e colaboradores (1993) verificaram que a citotoxicidade está relacionada com a quantidade de cobre dos compostos. E isso sugere que a citotoxicidade de um composto terapêutico esta diretamente relacionada ao microambiente celular que a célula alvo se encontra.

No caso do teste de citotoxicidade utilizando macrófagos, os ligantes livres (E1, E2 e E3) geraram menores danos celulares (figuras 49, 50 e 51), seguido pelo composto B3, complexo com níquel e C3, complexo com ferro. No caso do teste com os fibroblastos o composto C1, complexo com ferro não apresentou toxicidade às células tanto em 24 horas, quanto em 48 horas de exposição. Não sendo possível nesse ensaio a realização da curva dose resposta, e a definição do cálculo do valor de IC50. E o composto C3 divergentemente do que ocorreu com os macrófagos, apresentou baixa toxicidade as células em 24 horas, e nenhuma com 48 horas de exposição, também não sendo possível realizar o cálculo do valor da IC50.

Assim, nossos dados sugerem que, frente aos testes realizados e a necessidade da citotoxicidade ser seletiva apenas para Leishmania, o composto C3 complexado com Fe apresenta-se como o mais promissor na busca por um candidato a estudos mais complexos para o tratamento da Leishmaniose Visceral.

6. CONCLUSÃO

- Em nosso estudo foram testados 15 compostos utilizando bases de schiff complexados com metais de transição, destes, 11 apresentaram efeito inibitório para promastigota de *Leishmania chagasi in vitro*.
- Para maior inibição foi observado que os compostos complexados com cobre apresentaram maiores taxas de inibição *in vitro*, contudo estes compostos apresentaram citotoxicidade em macrófagos e fibroblastos.
- O complexo de Methoxy com Ferro apresentou boa atividade leishmanicida, com valor de IC50 16,22 µg/mL e baixa citotoxicidade contra macrófagos.
- Assim, nossos dados sugerem que esses compostos complexados com Fe, principalmente o composto C3 pode ser promissor na busca por compostos para o tratamento da leishmaniose visceral. Estudos futuros *in vitro*, com formas amastigotas, e em animais poderão comprovar sua eficácia em ensaios pré-clínicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches, P.; Conceicao-Silva, F.M.; Silva-Pereira, M.C. Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.87, p.197–200, 1984.
- Alencar, J.E.; Dietze, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-17.
- Almeida, R.P.; Barral-Netto, M.; De Jesus, A.M.; De Freitas, L.A.; Carvalho, E.M.; Barral, A. 1996. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* 54: 178-184.
- Alvar J.; Aparicio P.; Aseffa A.; Den Boer M.; Cañavate C.; Dedet J.P.; Gradoni L.; Ter Horst R.; López-Vélez R.; Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v.21, p. 334–359, 2008.
- Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern C.; Herrero M.; Desjeux, P.; Cano J.; Jannin, J.; den Boer M. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 7(5).
- Alves, W.A. Controle da leishmaniose Visceral baseado no reservatório canino. *Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas*, p. 94-98, 2006.
- Amóra, S.S.A.; Bevilaqua C.M.; Dias Ede, C.; Feijó, F.M.; Oliveira, P.G.; Alves N.D.; Oliveira, L.M.; Macedo, I.T. Monitoring of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.19, n.1, p.41-45, 2010.
- Andrade, A.J.; Andrade, M.R.; Barata, R.A.; Pinto, M.C.; Dias, E.S.; Eiras, A.E. Quatro novos registros da fauna flebotomínica do gênero *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) do distrito rural de Brejo do Mutambal, Varzelândia, MG. *Neotropical Entomology*, v.36, n.6, 2007.
- Arena, G.; Bindoni M.; Cardile V., Maccarrone, G., Riello M.C.; Rizzarelli E., Sciuto, S. Citotoxic and cytostatic activity of copper(II) complexes. Importance of the speciation for the correct interpretation of the in vitro biological results. *J Inorg Biochem*, v. 50, n.1, p.31-45, 1993.
- Ashford, D.A.; David, J.R.; Freire, M.; Shelorck, I.; Eulálio, M.C.; Sampaio, D.P.; Badaró, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine*, v.55, n.1, p.53-57, 1998.
- Ashford, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* v.30, p.1269–1281, 2000.
- Ayres, D.C.; Marcuci, M.C.; Giorgio, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.102, n.2, p.2015-220, 2007.
- Baneth, G.; Koutinas, A.F.; Solano-Gallego, L.; Bourdeau, P.; Ferrer, L. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, v.24, n.7, p.324-330, 2008.
- Barata, R.A.; França-Silva, J.C.; Mayrink, W.; Silva, J.C.; Prata, A.; Lorosa, E.S.; Fiúza, J.A.; Gonçalves, C.M.; Paula, K.M.; Dias, E.S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneo em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Ver. Da Soc. Bras. De Med. Trop.*, v.38, n.5, p. 421-425, 2005.

- Barbosa, R.; Costa, I.C.C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Scientia Médica*, v.23, p.5-11, 2013.
- Barrett, M.P.; Croft, S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br Med Bull*, v.104, n.1, p.175–196, 2012.
- Berman, J.D.; Badaro, R.; Thakur, C.P.; Wasunna, K.M.; Behbehani, K.; Davidson, R.; Kuzoe, F.; Pang, L.; Weerasuriya, K.; Bryceson, A.D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull. World Health Organ*, v.76, n.1, p.25-32, 1998.
- Berman, J.D.; Lee, L.S. Activity of 8-aminoquinolines against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.32, p.753–759, 1983.
- Bern, C.; Chowdhury, R. The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. *Indian J Med Res*, v.123, p.275–288, 2006.
- Bern, C.; Hightower, A.W.; Chowdhury, R.; Ali, M.; Amann, J.; Wagatsuma, Y.; Haque, R.; Kurkjian, K.; Vaz, L.E.; Begum, M.; Akter, T.; Cetre-Sossah, C.B.; Ahluwalia, I.B.; Dotson, E.; Secor, W.E.; Breiman, R.F.; Maguire, J.H. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases* v.11, p.655–662, 2005.
- Bhattacharya, S.K.; Sinha, P.K.; Sundar, S.; Thakur, C.P.; Jah, T.K.; Pandey, K.; Das V.R.; Kumar, N.; Lal, C.; Verma, N.; Singh, V.P.; Ranjan, A.; Verma, R.B.; Anders, G.; Sindermann, H.; Ganguly, N.K. Phase IV trial of miltefosine in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* v.196, p.591–598, 2007.
- Bolos, C.A.; Papazisis, K.T.; Kortsaris, A.H.; Voyatzi, S.; Zambouli, D.; Kyriakidis, D.A. Antiproliferative activity of mixed-ligand dien-Cu(II) complexes with thiazole, thiazoline and imidazole derivatives. *J. Inorg. Biochem.*, v.88, n.1, p.25-36, 2002.
- Borborema, S.E.T.; Schwendener, R.A.; Junior, J.A.O.; Andrade Junior, H.F.; Nascimento, N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (*Leishmania*) major-infected macrophages. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.38, p.341, 2011.
- Borges, B.K.A. Fatores de risco para leishmaniose visceral em Belo Horizonte, 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Braga, R.R.; Lainson, R.; Shaw, J.J.; Ryan, L.; Silveira, F.T. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.80, p.143–145, 1986.
- Braga, M.D.M.; Coêlho, I.C.B.; Pompeu, M.M.L.; Evans, T.G.; MacAullife, I.T.; Teixeira, M.J.; Lima, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31, n.5, p.419-424, 1998.
- Brasil. Ministério da Saúde (2014) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1.ed., 5.reimpressão. Brasília, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 120 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. AIDS 2009: versão preliminar. Boletim Epidemiológico: AIDS/DST. 2009; v.6, n.1, p.3-68.

Brasil. Brasil, (2009) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde (2011). Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília, Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em saúde. 112p.

Brasil. Ministério da Saúde (2011). Leishmaniose visceral Recomendações clínicas para a redução da letalidade. Brasília, Secretária de Vigilância em saúde. 82p.

Brasil. Ministério da Saúde. 2013. Disponível em: www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados. Acesso em: 2 de maio de 2015.

Bryceson, A. Leishmaniasis. In: Cook, G.C. (Ed.) *Manson's Tropical Diseases*. 20.ed. London: W.B. Saunders, p.1213-1243, 1996.

Bryceson, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop.Med. Int. Health* v.6, p.928–934, 2001.

Caldas, A.J.M.; Lisbôa, L.L.C.; Silva, P.F.; Coutinho, N.P.S.; Silva, T.C. Perfil das crianças com leishmaniose visceral que evoluíram para óbito, falha terapêutica e recidiva em hospital de São Luís, Maranhão. *Rev Pesq Saúde*, v.14, n.2, p.91-95, 2013.

Camargo-Neves, V.L.F. A leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 1, p.1-4, 2004.

Carvalho, M.R.; Valença, H.F.; Silva, F.J.; Pita-Pereira, D.; Araújo, Pereira, T.; Britto, C.; Brazil, R.P; Brandão Filho, S.P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.*, v.116, n.1, p.108-110, 2010.

Castilla, J.; Mesa-Valle, C.; Sanchez-Moreno, M.; Arnedo, T.; Rosales, M.; Mascaro, C.; Craciunescu, D.; Osuna, A. *Arzneim. In vitro* activity and biochemical effectiveness of new organometallic complexes of osmium(III) against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *Forsch./Drug Res.* 1996, v.46, p.990-996.

Chan-Bacab, M.J.; Pena-Rodriguez, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat.Prod.Rep.* v.18, p.674-688, 2001.

Chang, K.P.; Chaudhuri, G.; Fong, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.44, p.499-529, 1990.

Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R.W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology* v.5, p.873–882, 2007.

Chunge, C. N.; Owate, J.; Pamba, H.O.; Donno, L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.84, p.221–225, 1990.

Cimernman, Z.; Galic, N.; Bosner, B. The Schiff bases of salicylaldehyde and aminopyridines as highly sensitive analytical reagents. *Anal. Chem. Acta.*, v.343, p.145, 1997.

- Collin, S.; Davidson, R.; Rotmeijer, K.; Keus, K.; Melaku, Y.; Kipngetich, S.; Davied, C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin. Infect. Dis.* v.38, p.612–619, 2004.
- Costa, C.H.; Werneck, G.L.; Rodrigues, L.Jr.; Santos, M.V.; Araujo, I.B.; Moura, L.S.; Moreira, S.; Gomes, R.B.; Lima, S.S. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* v.99, p.229–236, 2005.
- Costa, P.L.; Dantas-Torres, F.; Silva, F.J.; Guimarães, V.C.F.V.; Gaudêncio, K.; Brandão-Filho, S.P. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an área of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. *Acta Tropica* v.126, p.99-102, 2013.
- Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, v.19, p.502-508, 2003.
- Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* v.19, p.111-126, 2006.
- Cruz, A.K.; de Toledo, J.S.; Falade, M.; Terraio, M.C.; Kamchonwongpaisan, S.; Kyle, D.E.; Uthaipibull, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. *Curr. Drug Targets*, v.10, n.3, p.178-192, 2009.
- Cunningham, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v.72, p.132-141, 2002.
- David, Jr.; Stamm, L.M.; Bezerra, H.S.; Souza, R.N.; Killick-Kendrick, R.; Lima, J.W.O. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* v.96, n.6, p.839 - 847, 2001.
- Deniau, M.; Canavate, C.; Faraut-Gambarelli, F.; Marty, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v.97 (Suppl. 1), p.115–133, 2003.
- Desjeux, P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, v.190(1–2), p.77–79, 2001.
- Desjeux, P. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *World Health Organization- Weekly Epidemiological Record* v.44, p.365-372, 2002.
- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.27, p.305-318, 2004.
- Elnaiem, D.A.; Hassan, M.M.; Maingon, R.; Nureldin, G.H.; Mekawi, A.M.; Miles, M.; Ward, R.D. (2001) The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Parasitology* v.122, p.531–536.
- Faucher, B.; Piarroux, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. *La Revue de Médecine Interne*, v.32, n.9, p.544-551, 2011.
- Fernandez-Bellon, H.; Solano-Gallego, L.; Bardagi, M.; Alberola, J.; Ramis, A.; Ferrer, L. (2006) Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet. Parasitol.* v.135, p.181–185.
- França-Silva, J.C.; da Costa, R.T.; Siqueira, A.M.; Machado-Coelho, G.L.; da Costa, C.A.; Mayrink, W.; Vieira, E.P.; Costa, J.S.; Genaro, O.; Nascimento, E. Epidemiology of canine visceral leishmanioses in the

endemic área of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* v.111, p.161-173, 2003.

Fricke, S.P.; Mosi, R.M.; Cameron, B.R., Baird, I.; Zhu, Y.; Anastassov, V.; Cox, J.; Doule, P.S.; Hansell, E.; Lau, G.; Langille, J.; Olsen, M.; Qin, L.; Skerj, R.; Wong, R.S.; Santucci, Z.; Mckerrow, J.H. Metal compounds for treatment of parasitic diseases. *J. inorg. Biochem.* 2008, v.102, n.10, p.1839-45.

Galati, E.A.; Nunes, V.L.; Rego Júnior, F.A.; Oshiro, E.T.; Chang, M.R. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica.* v.31, n.4, p.378-390, 1997.

Gaygani, A.S.; Hodjati, M.H.; Mohite, H.; Davies, C.R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. *Lancet* 360, p.374–379, 2002.

Gramiccia, M.; Gradoni, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, p.1169–1180, 2005.

Giffoni, J.H.; Almeida, C.E.; Santos, S.O.; Ortega, V.S.; de Barros, A.T. Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis: effect on disease prevalence and the vectors (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area. *Veterinary Therapeutics*, v.3, n.4, p.485-492, 2002.

Harhay, M.O.; Olliaro, P.L.; Costa, D.L.; Costa, C.H. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* v.27, p.403-409, 2011.

IUPAC - International Union Pure and Applied Chemistry. Disponível em: <www.iupac.org/goldbook/102957.pdf> acesso em: 25 de julho de 2015.

Jennette, K.W.; Lippard, S.J.; Vassiliades, G.A.; Bauer, W.R. Metallointercalation reagents 2-hydroxyethanethiolato(2,2',2'-terpyridine)-platinum(II) monocation binds strongly to DNA by intercalation. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.71, p.3839-43, 1994.

Jeronimo, S.M.B.; de Queiroz Sousa, A.; Pearson, R.D. (2006) Leishmaniasis. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds. *Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice.* Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone Elsevier, p.1095–1113.

Jha, S.N.; Singh, N.K.; Jha, T.K. 1991. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J. Assoc. Physicians India* v.39, p.314–316.

Jha, T.K.; Olliaro, P.; Thakur C.P.N.; Kanyok, T.P.; Singhania, B.L.; Singh, I.J.; Singh, N.K.P.; Akhoury, S.; Jha, S. (1998) Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *British Medical Journal* v.316, p.1200-1205.

Kaur, G.; Rajput, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. *J. Parasitol. Res.* 2014.

Khan, M.I.; Khan, A.; Hussain, I.; Khan, M.A.; Gul, S.; Iqbal, M.; Inayat-Ur-Rahman, Khuda, F. Spectral, XRD, SEM and biological properties of new mononuclear Schiff base transition metal complexes. *Inorg Chem Communications* v.35, p.104-109, 2013.

Koehler, K.; Stechele, M.; Hetzel, U.; Domingo, M.; Schonian, G.; Zaher, H.; Burkhardt, E. (2002) Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* v.109, p.9–17.

Lachaud, L.; Chabbert, E.; Dubessay, P.; Dereure, J.; Lamothe, J.; Dedet, J.P.; Bastien, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, v.125, p.197-207, 2002.

de La Rosa, R.; Pineda, J.A.; Delgado, J.; Macías, J.; Morillas, F.; Mira, J.A.; Sánchez-Quijano, A.; Leal, M.; Lissen, E. Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2002; v.40, p.762–767.

Macedo, I.T.F.; Bevilaqua, C.M.L.; Morais, N.B.; Sousa, L.C.S.; Linhares, F.E.; Amóra, S.S.A.; Oliveira, L.M.B. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal* v.18, p.67-74, 2008.

Maciel, M.V.; Morais, S.M.; Bevilaqua, C.M.L.; Silva, R.A.; Barros, R.S.; Sousa, R.N.; Sousa, L.C.; Brito, E.S.; Sousa-Neto, M.A. Chemical composition of Eucalyptus spp. Essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, v.167, n.1, p.1-7, 2010.

Maia, C.; Nunes, M.; Campino, L. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *Vector - Vector borne zoonotic dis*, v.8, p.4, 2008.

Maia-Elkhoury, A.N.S.; Alves, W.A.; Sousa-Gomes, M.L.; Sena, J.M.; Luna, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*. v.24, n.12, p.2941-2947, 2008.

Maroli, M.; Mizzoni, V.; Siragusa, C.; D’Orazi, A.D.; Gradoni, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. and Vet. Ent.* v.15, p.358 - 363, 2001.

Mesa-Valle, C.; Moraleda-Lindez, V.; Craciunescu, D.; Alonso, M.; Osuna, A. In vitro action of New organometallic compounds against tripanosomatidae protozoa. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, v.43, p.1010-1013, 1993.

Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Oliva, G.; Baneth, G. (2008) Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* v.24, n.8, p.371-377.

Mohebbi, M.; Hajjarian, H.; Hamzavi, Y.; Mobedi, I.; Arshi, S.; Zarei, Z.; Akhoundi, B.; Naeini, K.M.; Avizeh, R.; Fakhar, M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol.*, v.129, n.3-4, p.243-51, 2005.

Montoya-Lerma, H. Cadena, M. Oviedo, P.D. Ready, R. Barazorte, B.L. Travi, R.P. Lane. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.*, v.85, p.19–29, 2003.

Morais, A.N.; Sousa, M.G.; Meireles, L.R.; Kesper, N.Jr.; Umezawa, E.S. Canine Visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.22, n.2, p.225-9, 2013.

More, B.; Bhatt, H.; Kukreja, V.; Ainapure, S.S. (2003) Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. *J.Postgrad.Med.* v.49, p.101-103.

Moreira, E.D.; Mendes de Souza, V.M.; De Sreenivasan, M.; Nascimento, E.G.; de Carvalho, L.P. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Veterinary Parasitology*, v.122, n.4, p.245-252, 2004.

- Moreira, M.A.; Luvizotto, M.C.; Garcia, J.F.; Corbett, C.E.; Laurenti, M.D. (2007) Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology* v.145, p.245–52.
- Moreno, J.; Canavate, C.; Chamizo, C.; Laguna, F.; Alvar, J. HIV–*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.94, p.328–332, 2000.
- Moreno, I.; Álvarez, J.; García, N.; de la Fuente, S.; Martínez, I.; Marino, E.; Toraño, A.; Goyache, J.; Vilas, F.; Domínguez, L. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagonorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet. Parasit.* v.199, p.264–267, 2014.
- Moura, S.T.; Fernandes, C.G.N.; Pandolpho, V.C.; Rodrigues e Silva, R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.2, p.101-102, 1999.
- Murray, H.W. Kala-azar as an AIDS-related opportunistic infection. *AIDS Patient Care STDs* v.13, p.459–465, 1999.
- Najim, R.A.; Sharquie, K.E.; Farjou, I.B. Zinc sulphate in treatment of cutaneous leishmaniasis: in vitro and animal study. *Mem Inst Oswald Cruz* v. 93, n.6, p.831-837, 1998.
- Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.J.; Sierralta, A.; Fernández-Mestre, M.; Arriche, P.S.D.; Marchán, E. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. *J Biol Inorg Chem.* v.8: p.401-408, 2003.
- Navarro, M.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Gambino, D. Metal-based for malária, trypanosomiasis and leishmaniasis: recente achievements and perspectives. *Drug Discovery Today* v.15, p.1070-1078, 2010.
- Neal, R.A.; Croft, R.A. 1984. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* v.14, p.463–475, 1984.
- Neldner, K.H.; Hambidge, K.M.; Walravens, P.A. Acrodermatitis enteropathica. *Int J Dermatol.* v.17, n.5, p.380-387, 1978.
- Noli, C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus*, v.9, n2, p.16-24, 1999.
- Noli, C.; Auxilia, S.T. (2005) Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology.* v.16, p.213-32, 2005.
- Nunes, V.L.B.; Galati, E.A.B.; Cardozo, C.; Rocca, M.E.G.; de Andrade, A.R.O.; Santos, M.F.C.; Aquino, R.B.; da Rosa, D. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.52, n.3, p.446-451, 2008.
- Olliaro, P.L.; Guerin, P.J.; Gerstl, S.; Haaskjold, A.A.; Rottingen, J.A.; Sundar, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect. Dis.*, v.5, n.12, p.763-774, 2005.
- Oliveira-Neto, M.P.; Schubach, A.; Mattos, M.; Goncalves-Costa, S.C.; Pirmez, C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, v.57, n.6, p.651-655.

- Oliveira, S.S.; Araújo, T.M. (2003) Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cad Saúde Pública* v.19, p.1681-1690.
- Ordóñez-Gutiérrez, L.; Espada-Fernández, R.; Dea-Ayuela, M.A.; Torrado, J.J.; Bolas-Fernández, F.; Alunda, J.M. (2007) In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int.J.Antimicrob.Agents* v.30, p.325-329.
- Paranhos-Silva, M.; Nascimento, E.G.; Melro, M.C.B.F.; Oliveira, G.G.S.; dos Santos, W.L.C.; Pontes-de-Carvalho, L.C.; Oliveira-dos-Santos, A.J. Cohort study on canine emigration and leishmania infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Tropica*, v.69, n.1, p.75-83, 1998.
- Paris, C.; Loiseau, P.M.; Bories, C.; Bréard, J. miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, v. 48, n. 3, p.852-859, 2004.
- Pearson, R.D.; Jeronimo, S.M.B.; Queiroz, A.S. Leishmaniasis. In RL Guerrant, DH Walker, PF Weller (eds), *Tropical Infections Diseases. Principles, Pathogen & Practice*, Churchill Livingstone, Philadelphia, p.797-813, 1999.
- Pelissari, D.M.; Cechinel, M.P.; de Sousa-Gomes, M.L.; de Lima Junior, F.E.F. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, Brasília, v.20, n.1, p.107-110, 2011.
- Perez-Victoria, F. J.; Gamarro, F.; Ouellette, M.; Castanys, S. 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* v.278, p.49965–49971.
- Peters, N.C.; Egen, J.G.; Secundino, N.; Debrabant, A.; Kimblin, N.; Kamhawi, S.; Lawyer, P.; Fay, M.P.; Germain, R.N.; Sacks, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, p.970–974, 2008.
- Plano, D.; Baquedano, Y.; Moreno-Mateos, D.; Font, M.; Jiménez-Ruiz, A.; Palop, J.A.; Sanmartín, C. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, v.46, p.3315-23, 2011.
- Ramírez-Macías, I.; Marín, C.; Salas, J.M.; Caballero, A.; Rosales, M.J.; Villegas, N.; Rodríguez-Dieguez, A.; Barea, E.; Sánchez-Moreno, M. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5- α]pyrimidin-7(4H)-one against *Leishmania* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* v.66, n.4, p.813-819, 2011.
- Ramírez-Macías, I.; Maldonado, A.R.; Marín, C.; Olmo, F.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Rosales, M.J.; Quirós, M.; Salas, J.M.; Sánchez-Moreno, M. In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *J of Inorg Biochem* v. 112, p.1-9, 2012.
- Reithinger, R.; Coleman, P.G.; Alexander, B.; Vieira, E.P.; Assis, G.; Davies, C.R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal of Parasitology*, v.34, n.1, p.55-62, 2004.
- Ribeiro, A.L.M.; Missawa, N.A.; Zeilhofer, P. Distribution of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of medical importance in Mato Grosso State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v.49, n.5, p.317-321, 2007.

- Rolão, N.; Martins, M.J.; Joao, A.; Campino, L. (2005) Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* v.12, p.183–186.
- Romero, G.A.; Baelaert, M. 2010. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v.4, e584.
- Sacks, D.; Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.55, p.453-483, 2001.
- Salem, M.M.; Werbovetz, K.A. Natural products from plants as drugs candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current medicinal chemistry*, v.19, p.2571-2598, 2006.
- Salomón, O.D.; Quintana, M.G.; Bezzi, G.; Morán, M.L.; Betbeder, E.; Valdéz, D.V. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop.* v.113, n.1, p.84-87, 2010.
- Santos, S.O.; Arias, J.; Ribeiro, A.A.; De Paiva Hohhman, M.; De Freitas, R.A.; Malacco, M.A. (1998) Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* v.12, p.315–317.
- Seaman, J.; Mercer, A.J.; Sondorp, H.E.; Herwaldt, B.L. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann. Intern. Med.* v.124, p.664–672, 1996.
- Sharquie KE, AL-Azzawi KE. Intralesional therapy of cutaneous leishmaniasis with 2% zinc sulfate solution. *J Pan Arab League Dermatologists*, v.7, p.41-46, 1996.
- Sharquie, K.E.; Najim, R.A.; Farjou, I.B.; Al-Timimi, D.L. Oral zinc sulfate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* v.26, n.1, p.21-26, 2001.
- Shujah, S.; Zia-ur-Rehman; Muhammad, N.; Shah, A.; Ali, S.; Khalid, N.; Meetsma, A. Bioactive hepta- and penta-coordinated supramolecular diorganotin(IV) Schiff bases. *J of Organometallic Chemistry*, v.741-742, p.59-66, 2013.
- Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pacheco, R.S.; Fiuza, V.O.; Brazil, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Osw Cruz.* v.96 n.3, p.285-91, 2001.
- Silva, E.A.; Andreotti, R.; Honer, M.R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.4, p.420-425, 2007.
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Brasília: Leishmaniose: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>. Acesso em: 16 de maio de 2015.
- Sobrino, R.; Ferroglio, E.; Oleaga, A.; Romano, A.; Millan, J.; Revilla, M.; Arnal, M.C.; Trisciuglio, A.; Gortázar, C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* v.155, p.198-203, 2008.
- Solano-Gallego, L.; Morell, P.; Arboix, M.; Alberola, J.; Ferrer, L. (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* v.39, p.560–563.

- Solano-Gallego, L.; Fernández-Bellon, H.; Serra, P.; Gállego, M.; Ramis, A.; Fondevila, D.; Ferrer, L. (2003) Cutaneous leishmaniasis in three horses. *Equine Vet. J.* v.35, p.320–323.
- Solano-Gallego, L.; Rodríguez-Cortés, A.; Iniesta, L.; Quintana, J.; Pastor, J.; Espada, Y.; Portús, M.; Alberola, J. (2007) Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.76, p.676–680.
- Sousa-Gomes, M.L.; Maia-Elkhoury, A.N.S.; Pelissari, D.M.; Junior, F.E.F.L.; Sena, J.M.; Cechinel, M.P. HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais *Epidemiol. Serv. Saúde* v.20, n.4, p.519-26, 2011.
- Sousa, K.C.M.; Herrera, H.M.; Domingos, I.H.; Campos, J.B.V.; dos Santos, I.M.C.; Neves, H.H.; Machado, R.Z.; André, M.R. Serological detection of *Toxoplasma Gondii*, *Leishmania infantum* and *Neospora Caninum* in cats from na área endemic for leishmaniasis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.23, n.4, p.449-455, 2014-12.
- Sundar, S.; Thakur, B.B.; Tandon, A.K.; Agrawal, N.R.; Mishra, C.P.; Mahaptra, T.M.; Singh, V.P. (1994) Clinico-epidemi- ological study of drug resistance in Indian kala-azar. *British Medical Journal* 308, p.307.
- Sundar, S.; Sinha, P.R.; Agrawal, N.K.; Srivastava, R.; Rainey, P.M.; Berman, J.D.; Murray, H.W.; Singh, V.P. (1998) A cluster of severe antimony cardiotoxicity in kala-azar due to high osmolality lot. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v.59, p.139-143.
- Sundar, S.; Chatterjee, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.*, v.123, n.3, p.345-352, 2006.
- Sundar, S.; Rai, M. (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v.9, p.951-958.
- Sundar, S.; Singh, V.P.; Sharma, S.; Makharia, M.K.; Murray, H.W. (1997) Response to interferon-c plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* v.176, p.1117-1119.
- Tahghighi, A. Importance of metal complexes for development of potencial leishmanicidal agents. *J of Orgnometallic Chem*, v.770, p.51-60, 2014.
- Thakur, C.P. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.94, p.156–157, 2000.
- Thakur, C.P.; Kanyok, T.P.; Pandey, A.K.; Sinha, G.P.; Zaniewski, A.E.; Houlihan, H.H.; Olliaro, P. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.94, p.429–431, 2000.
- Tolezano, J.E.; Uliana, S.R.; Taniguchi, H.H.; Araújo, M.F.; Barbosa, J.A.; Barbosa, J.E.; Floeter-Winter, L.M.; Shaw, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.149, n.3-4, p.280-284, 2007.
- Uesugi, Y.; Kawata, H.; Satio, Y.; Tabata, Y.; Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatina nano-complexes of tissue-type plsminogen activator. *J Drug Target*, 2012, v.20, n.3, p.224-234.

Werneck, G.L.; Costa, C.H.; Walker, A.M.; David, J.R.; Wand, M.; Maguire, J.H. (2007) Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* v.135, p.195–201.

WHO. World Health Organization. *The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002.

WHO. World health Organization. Leishmaniasis Control. 2007. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/en>

WHO. World Health Organization. Technical Report Series. Control of the Leishmaniasis. 2010.

WHO. World Health Organization. WHO report on neglected tropical diseases Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva. 2010. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/en/>

WHO. World Health Organizatio. Leishmaniasis. 2015. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 13 de abril de 2015.

WHO. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2015. Disponível em: <www.who.int/neglected_diseases/en/>

Xavier-Gomes, L.M.; Costa, W.B.; Prado, P.F.; Oliveira-Campos, M.; Leite, M.T.S. Características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose visceral em crianças internadas em um hospital universitário de referência no norte de Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Epidemiol*. v.12, n.4, p.549-55, 2009.

Yardley, V.; Croft, S.L.; De Donker, S.; Dujardin, J.C.; Koirala, S.; Miranda, C.; Llanos-Cuentas, A.; Chappuis, F. 2005. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. v.73, p.272–275.

Zhang, C.X.; Lippard, S.J. (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol*. v.7, p.481.