



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA INDUZIDA POR
COMPLEXOS METÁLICOS A BASE DE PRATA

PAULINE DE FARIA SOLDERA

MANAUS – AM

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA INDUZIDA POR
COMPLEXOS METÁLICOS A BASE DE PRATA

PAULINE DE FARIA SOLDERA

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para a Saúde.

Orientação: Antonia Maria Ramos Franco, PhD, INPA, BR

Co-orientação: Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski, Msc.INPA, BR

Marina Porchia, IENI-CNR, IT

MANAUS – AM

Abril, 2016

AGRADECIMENTOS

- Agradeço todas as forças superiores, pela determinação e força;
- À minha orientadora, Dra. Antonia Maria Ramos Franco, por ter me aceito como aluna, ter acreditado em mim e, mesmo com o tempo curto e a correria do dia-a-dia, conseguir arrumar tempo para me ensinar sempre mais. Muito Obrigada!!
- À minha querida co-orientadora, amada amiga, Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski. Muitíssimo obrigada por tudo! Pela paciência, amizade, companheirismo, ensinamentos, sessões de “nerdices” na “salinha” do laboratório. Muito obrigada!! MAY THE FORCE BE WITH YOU =)
- À Dra. Marina Porchia e Dr. Francesco Tisato, do IENI-CNR, da Itália;
- À minha mãe, Rose, minha inspiração de vida, Joaquim, meu padrinho que assumiu o papel de pai, minha tia-mãe Fátima, e minhas primas-irmãs, Thaís e Laís, que tanto me incentivaram, vibraram mais que eu quando contei que tinha passado na seleção do mestrado e me ajudaram de todas as formas possíveis e quase impossíveis, aturando meu mau humor e estresse em tempos de qualificar e defender. Muito obrigada, vocês são a razão do meu viver;
- À querida e amada Ana Flávia da Silva Chagas, amiga, companheira, parceira de todas as horas e situações, não importando qual era a emergência. Muitíssimo obrigada por toda ajuda, nos experimentos e no lado pessoal e emocional, acho que sem tua ajuda e incentivo, teria sido mais difícil conseguir terminar o mestrado. Conte sempre comigo, porque a amizade vai durar muito, muito, muito tempo. Muito, muito, muito obrigada por tudo!!
- Aos meus queridos e amados “podréticos” Fabiane Veloso Soares, Fabiiii, e Pedro Rael Cândido Domingos, “menino” Pedro e Bruno Bezerra Jensen, Bruninho, muito

obrigada por tudo. Vocês foram peças mais que necessárias para a conclusão do meu mestrado, ajudando sempre que precisava, aconselhando de forma sábia, sendo mais que amigos, irmãos. Não vai dar pra esquecer nossas fugidinhas para almoçar, fazer comprinhas, passear. Obrigada por todas as risadas, bagunças, lanchinhos, muito obrigada por todo o companheirismo e ajuda!

- À Maricleide Farias Naiff, dona Mari, pelos puxões de orelha, ensinamentos, carinho, amizade, conselhos e elogios. Obrigada por ter sido a mãe do laboratório para mim e para todos que lá estão;
- À todos os técnicos, principalmente a Dra. Francimeire Gomes Pinheiro, Meiroca e Lourival, seu Loro, por todos os ensinamentos. Sou muito grata por tudo que me ensinaram. Muito obrigada!!
- Aos amigos Vivianne Pena, Paula Dantas, Lincoln Rayath, Wellison Brito, Andreia Rocha, Yuri Pastor e Jorge Viana, pelo incentivo, ajuda e torcida. Muito obrigada!!
- Aos meus amigos, de longa data, por entenderem quando sumia e não tinha tempo para sair ou conversar. Obrigada por me apoiarem e entenderem o sumiço, pois sabiam que o mestrado era algo que eu queria muito. Obrigada!
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas, FAPEAM, pelo apoio financeiro, na concessão de bolsa;
- À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade dessa Pós-graduação.
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA;
- À todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente.

MUITO OBRIGADA!

“Uma vez a Saori disse que todo ser humano deve viver de acordo com as estrelas sob as quais nasceu. Alguns nascem sob estrelas de sorte; outros, sob estrelas de azar. Mas eu só posso dizer que eu farei o possível, sejam quais forem as minhas estrelas.”

SEIYA DE PÉGASO

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecto – parasitária causada por um parasita do gênero *Leishmania* e transmitida pela picada do flebotomíneo fêmea infectado. Infecções humanas causadas pela *Leishmania* podem manifestar-se de diferentes formas, dependendo da espécie causal, como leishmaniose tegumentar (LT) ou leishmaniose visceral (LV). O arsenal terapêutico contra a LT ainda é muito restrito. Os antimoniais pentavalentes permanecem como as drogas de primeira escolha para o tratamento e, apesar de sua eficácia, apresentam efeitos colaterais, com tempo de tratamento prolongado. A Química Inorgânica Medicinal têm oferecido novas possibilidades para a pesquisa, e os metais, em especial os de transição, oferecem algumas vantagens sobre os fármacos, incluindo a variedade de estados de oxidação, permitindo sua participação em processos biológicos redox. No presente trabalho foi estudado o efeito *in vitro* de dois complexos metálicos a base de prata (Ag_1 e Ag_2), contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania. (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania. (Viannia) guyanensis* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Os complexos metálicos foram sintetizados pela equipe do “Istituto per l’Energetica e le Interfasi”, IENI, Pádua, Itália(CNR, Conselho Nacional de Pesquisas, IT) e encaminhados para testes biológicos no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Resultados dos bioensaios com *L. (L.) amazonensis* demonstraram que a substância Ag_2 apresentou maior atividade anti-leishmania na concentração de $160\mu\text{M}/\text{mL}$, no período de 72h, EC_{50} $14,53\ \mu\text{M}/\text{mL}$ no método de contagem manual, e pelo no método MTT, no período de 24h, com EC_{50} $11,35\ \mu\text{M}/\text{mL}$. Nos testes contra a forma amastigota, houve pouca infecção de macrófagos pelo complexo Ag_1 , 25% infectados, contra 61% sem infecção do formas amastigotas. Resultados com *L. (V.) guyanensis*, pelo método de contagem manual, Ag_1 não apresentou valores satisfatório, com do EC_{50} $>60\ \mu\text{M}/\text{mL}$, Ag_2 apresentou atividade moderada nos período de 24h e 48h, EC_{50} $43,22\ \mu\text{M}/\text{mL}$ e $57,64\ \mu\text{M}/\text{mL}$. Pelo método MTT as duas substâncias apresentaram valores

de $EC_{50} >60 \mu\text{M/ mL}$. Contra as formas amastigotas, com o complexo Ag_1 , houve a morte celular dos macrófagos. Ag_2 apresentou taxa de infecção de 38%, contra 47% de macrófagos não infectados. Sendo assim, os dois complexos metálicos não desempenharam bons resultados quando testados frente as formas promastigota e amastigota de *L. (V.) guyanensis*. Contra as formas de *L. (L.) amazonensis*, ambos complexos apresentaram resultados satisfatórios, sendo o complexo Ag_2 , tendo melhores resultados em formas promastigota e amastigota.

Palavras- Chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*; complexos metálicos; prata; bioensaios; tratamento

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease - parasitic caused by a parasite of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of infected female sandfly. Human infections caused by *Leishmania* can manifest in different ways, depending on the causal species, such as cutaneous leishmaniasis (CL) or visceral leishmaniasis (VL). The therapeutic arsenal against LT is still very restricted. The pentavalent antimony remain the drugs of choice for the treatment and, despite its efficacy, have side effects with prolonged treatment time. Medicinal Chemistry Inorganic have offered new possibilities for research, and metals, especially transition, offer some advantages over drugs, including the variety of oxidation states, enabling their participation in redox biological processes. In the present work we studied the in vitro effect of two metal complexes silver base (Ag1 and Ag2), against promastigotes and amastigotes of *Leishmania. (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania. (Viannia) guyanensis* in periods of 24, 48 and 72 hours. The metal complexes were synthesized by the team of "Istituto per l'Energetica and le Interfasi" IENI, Padua, Italy (CNR, National Research Council, IT) and sent to biological testing at the National Institute for Amazonian Research (INPA). Results of bioassays with *L. (L.) amazonensis* showed that Ag2 substance showed higher anti-leishmania activity in the concentration of 160 μ M/ml, from 72h, EC₅₀ 14.53 uM/ml in the manual counting method, and by the MTT method at 24 hours period with EC₅₀ 11.35 uM/mL. In cons tests the amastigote form, there was little infection of macrophages by Ag1 complex, 25% infected, compared with 61% without infection amastigotes. Results with *L. (V.) guyanensis*, the manual counting method, Ag1 did not show satisfactory values, with EC₅₀> 60 uM / ml, Ag2 showed moderate activity in the period of 24h and 48h, EC₅₀ 43.22 uM / ml and 57, 64 uM / ml. For the MTT the two substances had EC₅₀ values> 60 uM / ml. Against amastigote forms, with Ag1 complex was cell death of the macrophages. Ag2 showed 38% infection rate, with 47% of uninfected macrophages. Thus, the two metal complexes did

not perform well when tested across the promastigote and amastigote forms of *L. (V.) guyanensis*. Against forms *L. (L.) amazonensis*, both complexes showed satisfactory results, and the Ag2 complex, with better results in promastigote and amastigote forms.

Words- Key: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*; metal complexes; silver; bioassays; treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número total de casos de Leishmaniose Cutânea em 2013.....	22
Figura 2: Forma amastigota (A); forma promastigota (B).....	24
Figura 3: Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	28
Figura 4: Curva de crescimento de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (MHOM/BR/75/M4147) em meio Schneider completo.....	48
Figura 5: Atividade anti-leishmania do controle positivo (Pentacarinat®) sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	49
Figura 6: Atividade anti-leishmania do controle negativo (DMSO) sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	50
Figura 7: Curva de crescimento do controle negativo, composto por meio Schneider e parasita.....	50
Figura 8: Atividade anti – Leishmania do complexo de prata Ag_1 , $Ag(PTA)_4BF_4$, em comparação com Pentacarinat®.....	52
Figura 9 Atividade anti – Leishmania do complexo de prata Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$, em comparação com Pentacarinat®.....	52
Figura 10: Atividade anti – Leishmania do complexo de prata Ag_1 , $Ag(PTA)_4(BF)_4$, utilizando o método MTT.....	54
Figura 11: Atividade anti – Leishmania do complexo de prata Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$, utilizando o método MTT.....	55
Figura 12: Curva de crescimento de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHOM/BR/2009/IM5584) em meio Schneider completo.....	56
Figura 13: Atividade anti-leishmania do controle positivo (Pentacarinat®) sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	57

Figura 14: Atividade anti-leishmania do controle negativo (DMSO) sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	58
Figura 15: Curva de crescimento do controle negativo, composto por meio Schneider e parasita.....	58
Figura 16: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_1 , $Ag(PTA)_4(BF)_4$, em comparação com Pentacarinat®.....	60
Figura 17: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$, em comparação com Pentacarinat®.....	61
Figura 18: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_1 , $Ag(PTA)_4(BF)_4$, em cinco concentrações.....	62
Figura 19: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_2 $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$ em cinco concentrações.....	63
Figura 20: 20A) Bioensaio com macrófagos. 20A) Morte de macrófagos, quando testados com o complexo Ag_1 , $Ag(PTA)_4BF_4$, na concentração de $160\mu M/mL$; 20B) formas amastigotas (indicando na seta) de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> interiorizadas em macrófagos quando testadas com Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$; 20C) macrófagos com as formas amastigotas (indicando na seta) de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> interiorizadas, consistindo no grupo controle do bioensaio.....	66
Figura 21: Bioensaio com macrófagos. 21A) Formas amastigotas (indicando na seta) de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> interiorizadas em macrófagos, quando testada contra complexo Ag_1 , $Ag(PTA)_4BF_4$, na concentração de $160\mu M/mL$; 21B) formas amastigotas (indicando na seta) de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> interiorizadas em macrófagos quando testadas com Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$; 21C) macrófagos com as formas amastigotas (indicando na seta) de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> interiorizadas, consistindo no grupo controle.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de EC ₅₀ da atividade dos complexo Ag ₁ , Ag ₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	51
Tabela 2: Valores de EC ₅₀ da atividade do complexo Ag ₁ , Ag ₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> utilizando o método MTT.....	53
Tabela 3: Valores de EC ₅₀ da avaliação da atividade do complexo Ag ₁ , Ag ₂ e Pentacarinat® frente as formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	59
Tabela 4: Valores de EC ₅₀ da atividade do complexo Ag ₁ , Ag ₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> pelo método MTT.....	62
Tabela 5: Avaliação da citotoxicidade dos complexos metálicos Ag ₁ e Ag ₂ em macrófagos J774, após exposição de 24h.....	64
Tabela 6: Avaliação da infecção de macrófagos expostos aos complexos metálicos, Ag ₁ e Ag ₂ , na concentração de 160 µM/ mL frente às formas amastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	65
Tabela 7: Avaliação da infecção de macrófagos expostos aos complexos metálicos, Ag ₁ e Ag ₂ , na concentração de 160 µM/mL frente as formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais espécies do gênero <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i> que causam doença em humanos e suas formas clínicas.....	23
Quadro 2: Numero de casos e estimativas globais de incidência de leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)*.....	29

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO	17
2.0. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. Leishmaniose.....	21
2.2. Agente Etiológico.....	23
2.3. Vetores.....	26
2.4. Ciclo de Vida.....	26
2.5. Epidemiologia.....	28
2.6. Formas Clínicas.....	30
2.7. Tratamento.....	31
2.7.1. Tratamento de Primeira Escolha.....	31
2.7.2. Tratamento de Segunda Escolha.....	32
3.0. Complexos Metálicos e Sais de Metal.....	33
3.1. A prata e seu uso na medicina	35
4.0. OBJETIVOS.....	39
4.1. Geral.....	39
4.2. Específicos.....	39
5.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1. Preparo de Massa Parasitária.....	40
6.0. Compostos Químicos.....	40
7.0. Atividade <i>in vitro</i> anti-leishmania em formas promastigotas.....	41
7.1. Manutenção dos parasitas e preparo da massa parasitária.....	41
7.1.1 Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	41
7.1.2. Determinação da atividade anti-leishmania dos complexos solúveis de prata - Ensaio <i>in vitro</i>.....	42

7.1.3. Avaliação da viabilidade parasitária utilizando o método colorimétrico MTT.....	43
7.2. Atividade anti-leishmania <i>in vitro</i> em amastigota.....	44
7.2.1. Obtenção do macrófagos murinos e manutenção das células.....	44
7.2.2 Infecção dos macrófagos com <i>Leishmania</i> spp.	44
7.2.3. Determinação da atividade anti-leishmania dos complexos solúveis de prata em amastigotas interiorizados em macrófagos - ensaio <i>in vitro</i>	44
7.2.4. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de prata sobre macrófagos murinos (MTT).....	45
8.0. RESULTADOS	47
8.1. Curva de crescimento de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	47
8.2. Curva de crescimento dos controles positivo (Pentacarinat®), negativo (DMSO) e negativos (Meio Schneider completo acrescido de parasita).....	48
8.3. Atividade dos complexos metálicos frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , usando o método de contagem manual	51
8.4. Atividade dos complexos metálicos frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> , usando o método MTT	53
8.5. Curva de crescimento de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	55
8.6. Curva de crescimento dos controles positivo (Pentacarinat®), negativo (DMSO) e negativos (Meio Schneider completo acrescido de parasita).....	56
8.7. Atividade dos complexos metálicos frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , usando o método de contagem manual	59
8.8. Atividade dos complexos metálicos frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> , usando o método MTT	61

8.9. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de prata sobre macrófagos murinos (MTT).....	63
8.10 Determinação de atividade anti-leishmana dos complexos solúveis de prata em amastigotas interiorizados em macrófagos	64
9.0. Discussão	68
10.0 Conclusões	71
11.0. Referências Bibliográficas	73

1.0. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções crônicas, não contagiosas ao homem, causadas por parasitas que pertencem ao gênero *Leishmania*, que são transmitidas de animais infectados para o homem, pela picada de um inseto denominado flebotomíneo, podendo se manifestar nas formas cutânea, cutâneo-mucosa e visceral. A doença pode se apresentar em diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com o hospedeiro (GOTO e LINDOSO, 2010).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo, de forma alternada, em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes últimos, responsáveis pela transmissão do parasita de um mamífero para o outro (KILLICK e RIOUX, 1991).

Diversas espécies de *Leishmania* estão envolvidas na etiologia da doença no Brasil, em especial no Estado do Amazonas, estão a *Leishmania*. (*Leishmania*) *amazonensis*; *L. (Viannia) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L.(V.) naiffi* (SILVEIRA *et al.*, 2004).

As moléstias causadas pelos parasitas do gênero *Leishmania* apresentam formas clínicas distintas, tais como a leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (REY, 2010). O aspecto clínico da LT em humanos inclui as formas clínicas: cutânea (LC), cutânea disseminada (LCD), cutânea difusa (LCD) e mucosa (LM). As manifestações clínicas da doença são determinadas pelas características do hospedeiro, espécie de *Leishmania* presente e da resposta imune do indivíduo infectado (SAMPAIO e RIVITTI, 2008).

Os fármacos utilizados para o tratamento da LT pertencem à classe dos antimoniais pentavalentes, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®). Ambos apresentam toxicidade e casos de falha do tratamento são comuns, tanto por resistência de determinadas cepas do parasita, quanto por baixa atividade em pacientes imunodeprimidos ou descontinuidade do tratamento por parte do paciente devido

aos efeitos colaterais. Em casos de resistência do parasita, a Pentamidina® é outra opção de tratamento, sendo, entretanto, mais tóxica que o Pentostam® e o Glucantime® (CROFT; SUNDAR 2006).

De acordo com Alvar (2012), a leishmaniose é classificada como uma das principais doenças negligenciadas, ocupando, em 2012 o nono lugar, com base nos poucos recursos investidos no diagnóstico, tratamento, controle e associação com a pobreza (BERN *et al.*, 2008). Ela compreende um grupo de doenças com grande variedade e de alta complexidade com relação à epidemiologia, pois envolve diferentes espécies de *Leishmania*, vetores flebotomíneos e hospedeiros reservatórios. São descritas, de forma aproximada, 20 espécies de *Leishmania* que causam a doenças, sendo transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (SINGH, SRIVASTAVA E SINHG, 2012).

Aspectos das leishmanioses variam de acordo com a região geográfica, indicando, provavelmente, interação entre os parasitas locais, biologia dos vetores presentes na área e fatores populacionais (MURRAY *et al.*, 2005).

Na última década, medicamentos alternativos e novas formulações de fármacos tradicionais têm sido disponibilizados e já estão em uso em alguns países (CROFT, 2006). Entretanto, é pouco provável que estes estudos levem ao desenvolvimento de um único fármaco capaz de tratar todas as variantes das leishmanioses, com suas diferentes espécies causadoras e diferentes graus de resistência aos tratamentos tradicionais (CROFT; SEIFERT, 2006).

Devido aos sérios efeitos colaterais decorrentes da toxicidade dos compostos dos tratamentos primários, como antimoniais pentavalentes, Glucantime® e Estibogluconato de sódio (Pentostam®), como febre, tontura, mialgia e secundários, isotionato de pentamidina (Pentamidina®), como náuseas, desconforto abdominal, vômito, tontura, mialgias, cefaleia e da crescente frequência de resistência ao tratamento e das contra-indicações apresentadas

pelos fármacos, a busca por novas opções terapêuticas para o tratamento de leishmanioses torna-se evidente. E uma dessas novas opções seria o uso de complexos metálicos (GILMAN E GOODMAN, 2006; Oliveira *et al.*, 2005).

O uso de metais como fármacos representa um potencial considerável para aumentar o conjunto de drogas disponíveis para tratamento de uma série de enfermidades, dentre elas a leishmaniose. A interação que ocorre entre um íon metálico e um ligante dá a possibilidade de obter compostos com extensa variedade, estados de oxidação e geometrias (SEGURA, 2014). Além disso, as características do composto obtido permitem obter estruturas moleculares que possuem um amplo espectro de reatividade (BRUIJNINCX e SADLER, 2008).

Na literatura, encontram-se estudos que relatam a complexação de cátions metálicos, estabelecendo a estrutura do complexo formado e apontando o efeito dos íons metálicos na atividade antibacteriana (VIEIRA *et al.*, 2009), antifúngico (GUO, 1999) e antiparasitário quando na forma de nanopartículas (BAIOCCO *et al.*, 2011; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011; ABDULSADH *et al.*, 2013; JOB *et al.*, 2014) e atividade anticancerígena (SANTINI *et al.*, 2011). A natureza do ligante e a sua capacidade em formar um quelato com o metal favorecem a atividade biológica destes complexos metálicos. (ROCHA, 2011; SEGURA, 2014).

Dentre os metais utilizados como fármaco, a prata tem chamado bastante atenção, devido as suas propriedades nas aplicações médicas e químicas, que incluem atividade antibacteriana, elevada resistência à oxidação e condutividade térmica (LEE, 2007). Devido a sua propriedade antibacteriana, o nitrato de prata (AgNO_3) voltou a ser usado no tratamento de queimaduras e abscessos, o que aumentou o interesse em se realizar estudos com os complexos de prata. (SEGURA, 2014). A prata exibe baixa toxicidade nos seres humanos, e quando absorvida, ela entra no sistema circulatório complexada com proteínas, sendo então eliminada pelo fígado e pelos rins (LAM, 2014). O estudo de GREULICH (2013) mostrou

preocupação quanto aos níveis de citotoxicidade, que assemelha – se a algumas células de bactérias, mas tal citotoxicidade foi demonstrada apenas em estudos *in vitro*.

Porém, a exposição crônica pode levar a deposição de partículas de prata na pele (argiria) e em outros órgãos. Devido a esse acúmulo, tem – se procurado desenvolver novos complexos que liberem de forma lenta o íon de prata no organismo (BRANDT *et al.*, 2005). A sulfadiazina de prata a 1% é mais utilizada que o nitrato de prata (AgNO_3), por ser menos solúvel (RAGANH *et al.*, 2005), e ainda é eficaz especialmente contra bactérias Gram – negativas e alguma Gram – positivas (ALTAF *et al.*, 2013).

Com base nos bons resultados de complexos metálicos a base de prata como agentes antimicrobianos desde o século XX, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade *in vitro* anti-leishmania de dois complexos metálicos Ag_1 , correspondente a $\text{Ag}(\text{PTA})_4\text{BF}_4$ e Ag_2 , correspondente a $\text{Ag}(\text{PPh})_3(\text{HBPz})_3$ a base de prata, contra as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, causadoras das formas cutâneas da leishmaniose no Brasil.

2.0.REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Leishmaniose

A leishmaniose compreende um complexo de doenças infecciosas, causadas por parasitas pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia*. Estes parasitas têm como vetores várias espécies de insetos conhecidos como flebotomíneos. A doença pode se manifestar sob duas formas clínicas distintas, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), apresentando ampla distribuição pelo mundo, sendo que algumas espécies dos parasitas são restritas a determinadas localidades (GOTO *et al.*, 2010).

No final do século XIX, sete pesquisadores, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, de forma independente, identificaram o parasita causador da leishmaniose e Ronal Ross foi quem atribuiu o nome *Leishmania* e Nicolle que em 1908 sugeriu serem os cães os reservatórios do parasita. No Brasil, a presença do parasita *Leishmania* foi identificada em lesões de mucosas em pacientes no ano de 1912, por Carino. Durante os anos 40, Swaminath, Shortt e Anderson, na Índia, demonstraram a transmissão de *L.(L.) donovani* e *L.(L.) major* por flebotomíneos (OMS, 2010).

A leishmaniose está entre as dez principais doenças negligenciadas, com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento, controle e por estar ligada, diretamente com populações de baixa renda e em países em desenvolvimento (Figura 1) (ALVAR *et al.*, 2012).



Figura 1: Número total de casos de Leishmaniose Cutânea em 2013.

Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png?ua=1. Acesso em 20/08/2015

A LT é caracterizada pela manifestação de formas cutâneas, localizada ou difusa, podendo manifestar - se nas mucosas oral ou nasal (COSTA, 2005). Logo, diferentes formas clínicas da doença podem ser observadas com base na espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, além do perfil genético e imunológico do hospedeiro. A doença, então, pode variar entre a forma benigna, caracterizada pela presença de uma única úlcera cutânea localizada que pode se curar de forma espontânea, e doença crônica, latente e com tendência de disseminação (BITTENCOURT, 2005). No Novo Mundo, a LT, é chamada de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e é classificada de acordo com as manifestações clínicas, características histopatológicas e a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito. A LTA pode ser classificada em cutânea localizada, mucocutânea, cutânea disseminada e cutânea difusa (GONTIJO, 2003; SILVEIRA et al, 2004; SILVEIRA et al, 2009).

Muitas espécies de *Leishmania* são reconhecidas por causarem doença em humanos e com distribuições geográficas diferentes. No quadro 1 estão listadas as diversas espécies do parasita e suas formas clínicas, ressaltando o fato da importância da espécie de *Leishmania*

envolvida na infecção, bem como da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (REITINGER *et al.*, 2007).

Quadro 1: Principais espécies do gênero *Leishmania* e *Viannia* que causam doença em humanos e suas formas clínicas

Distribuição Geográfica			
Forma Clínica		Subgêneros	Espécie
Leishmaniose Tegumentar (LT)	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania (Leishmania) major</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i>
	Novo Mundo		<i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) venezuelensis</i>
Leishmaniose Tegumentar e Mucocutânea (LT/LM)	Novo mundo	<i>Viannia</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> <i>L. (V.) colombiensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i> <i>L. (V.) lainsoni</i> <i>L. (V.) naiffi</i> <i>L. (V.) shawi</i> <i>L. (V.) lindenbergi</i>
Leishmaniose Visceral (LV)	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (Leishmania) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) chagasi</i>
	Novo Mundo		

*Adaptada de (REITHINGER *et al.*, 2007).

2.2. Agente Etiológico

A doença leishmaniose é a infecção de um hospedeiro vertebrado com parasitas do gênero *Leishmania*. A forma flagelada promastigota (Figura 2B), encontrada no vetor flebotomíneo,

reproduz-se extracelularmente no trato alimentar do inseto. Já a forma encontrada no hospedeiro vertebrado é a amastigota (Figura 2A), se origina no interior do vacúolo parasitóforo, a partir da diferenciação de formas promastigotas regurgitadas pelo vetor e, então, fagocitadas pelos macrófagos. Não apresentam flagelo livre e são adaptadas à temperatura do organismo do mamífero e ao pH do vacúolo parasitóforo, seu local de multiplicação intracelular (CUNNINGHAM, 2002).

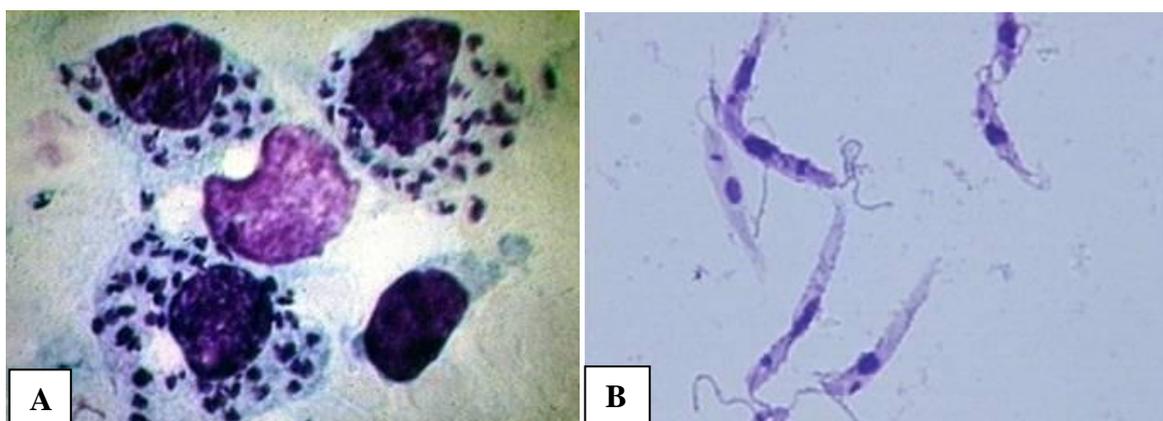


Figura 2: Forma amastigota (A); forma promastigota (B).

Fonte: http://fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Leishmania.htm

Dentro do macrófago, as formas amastigotas inibem os mais diversos mecanismos de defesa celular, que seriam responsáveis pela lise do mesmo, tais como fusão fago-endossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

O gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros, com base do desenvolvimento do parasita no vetor. O subgênero *Leishmania* cresce apenas na parte anterior do piloro, na junção do intestino médio e o grosso (desenvolvimento suprapilórico). O subgênero *Viannia* cresce em todo o intestino médio e grosso (desenvolvimento peripilórico). Diferentes tipos de parasitas causam vários tipos de leishmaniose, e cada um desses parasitas determina a característica de cada uma das doenças (OMS, 2010).

Entre as espécies de *Leishmania* presente no Brasil, a *L. (L.) amazonensis* possui elevada distribuição em todas as regiões. Outras também atingem o país como a *L. (V.) braziliensis* e a *L. (V.) guyanensis* (GONTIJO, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver a leishmaniose difusa (GONTIJO & CARVALHO, 2003). A forma cutânea tem distribuição nas florestas primárias e secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão). Sua presença é maior no Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Relatos indicam que roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* sejam os reservatórios desta espécie. Os vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia) (SILVEIRA *et al.*, 1997). Estas espécies são pouco antropofílicas, justificando assim a menor frequência de infecção humana (LAINSON, 1997).

A *L. (V.) guyanensis* causa, de forma predominante, lesões ulceradas cutâneas, únicas ou múltiplas (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Ao que tudo indica, limitada à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), tendo se estendido pelas Guianas. (SUS, 2012). É raro o comprometimento da mucosa pela *L. (V.) guyanensis*, atingindo principalmente indivíduos do sexo masculino, em fase produtiva. Em áreas que possuem endemia, encontra-se percentuais expressivos de crianças acometidas pela doença. Esta espécie já foi isolada de mamíferos silvestres, como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*Didelphis albiventris*), estando presente na pele e nas vísceras, que algumas evidências indicam que estes animais atuam como reservatórios. O principal vetor é *Lu. umbratilis* distribuída nos países de fronteira ao Brasil e também nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia (LAINSON & SHAW, 1997).

2.3. Vetores

Os insetos vetores das leishmanioses são denominados de flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae. São insetos hematófagos, não ultrapassando 0.5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas, corpo piloso, tendo como principal característica voo saltitante e asas eretas, mesmo quando em repouso. São de cor parda, recebendo assim o nome vulgar asa dura, asa branca, cangalha, cangalhinha, mosquito-palha, birigui, ligeirinho, pela-égua, arrupiado, entre outros (BASANO e CAMARGO, 2004; SACRAMENTO e MARQUES, 2011).

As fêmeas estão adaptadas com aparelho bucal para picar a pele de animais vertebrados e sugar o sangue. Necessitam do repasto sanguíneo para a maturação dos ovos. Muito pouco se sabe de seus criadouros e podem ser encontradas, em formas imaturas, em fendas de pedras, cavernas, raízes do solo e serrapilheira, em ambientes úmidos e nunca em lugares molhados (GUERRA *et al.*, 2007).

As espécies responsáveis pela transmissão da LV no Brasil são *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi* e as principais responsáveis pela LC são as *Lu. flaviscutellata*, *Lu. olmeca nociva* (vetor da *L.(L.) amazonensis*), *Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia*, *Lu. carrerai* (vetores da *L. (V.) braziliensis*), *Lu. umbratilis*, *Lu. Anduzei* e *Lu. whitmani* (vetores da *L.(V.) guyanensis*) (BASANO *et al.*, 2004).

2.4. Ciclo de Vida

O ciclo de vida das leishmanias possui uma fase extracelular, onde o parasita está dentro do trato digestivo do invertebrado vetor, e uma intracelular, dentro de macrófagos de hospedeiros mamíferos. As formas infectantes que são transmitidas para o hospedeiro

vertebrado são as promastigotas metacíclicas e as não infectantes são as procíclicas, porém, ambas são encontradas em culturas de células livres, onde as procíclicas se diferenciam em metacíclicas, que são mais abundantes na fase estacionária da cultura (SILVEIRA *et al.*, 2009).

O ciclo tem seu início durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea, quando, então, inocula formas promastigotas no hospedeiro vertebrado junto com saliva. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos residentes ou neutrófilos recrutados pela picada do inseto (RIBEIRO-GOMES E SACKS, 2012). Já dentro das células do sistema fagocítico mononuclear, as formas promastigotas vão se diferenciar em formas amastigotas (formas mais arredondadas, sem flagelo livre), e em seguida, se proliferam, estabilizando a infecção (Figura 3) (GOTO, 2010).

Um mecanismo de virulência tem sido proposto por englobar dois grupos diferentes de moléculas do parasita. Um deles é composto, principalmente, na superfície celular e em substâncias secretadas, formado por determinantes invasivos, que protegem o parasita e a célula do hospedeiro, impedindo que ela sofra lise de forma prematura, e ajudam as formas amastigotas a manterem, continuamente, a infecção através do crescimento baixo em vacúolos dos macrófagos do hospedeiro. Os antígenos intracelulares são expostos ao sistema imune do hospedeiro e os parasitas passam por citólise durante a infecção natural (CHANG *et al.*, 2003).

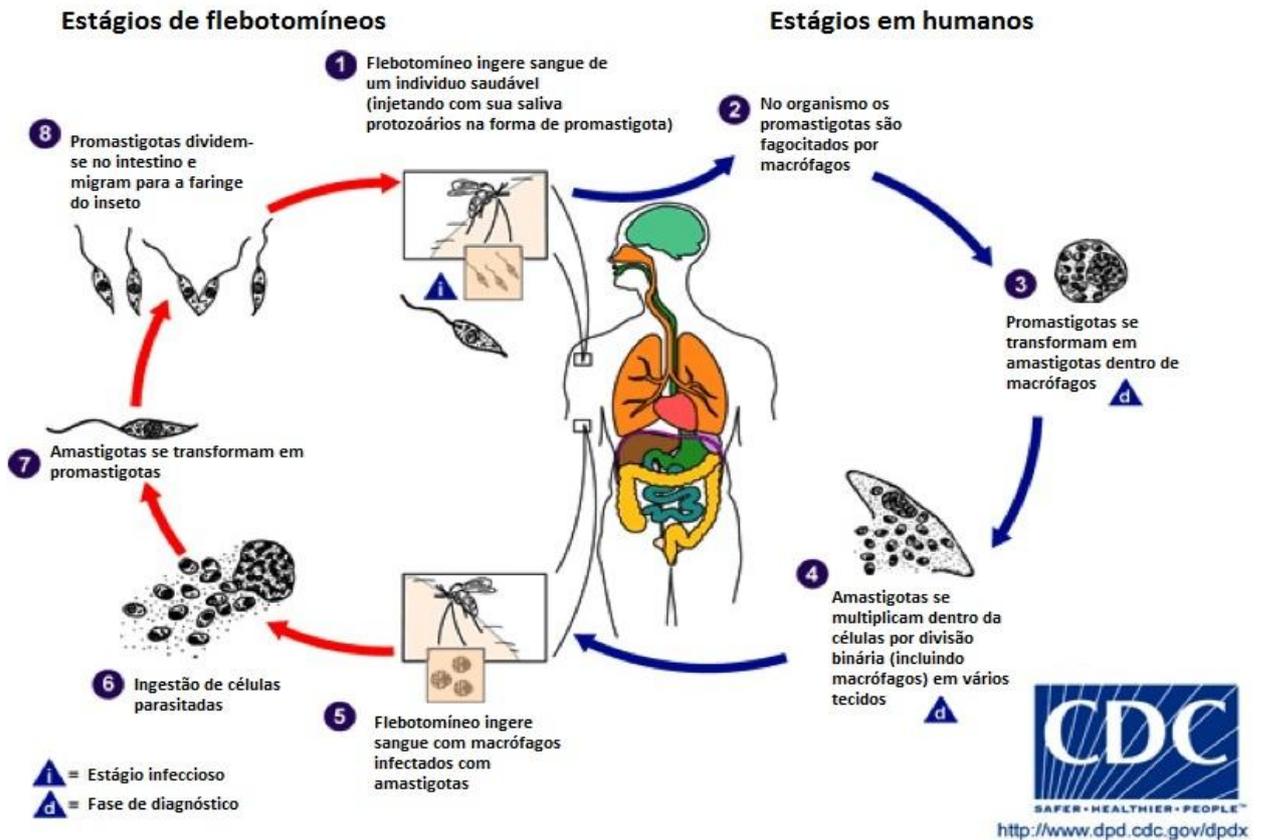


Figura 3: Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.

Fonte: <http://saude.culturamix.com/doencas/doencas-parasitarias-prevencao-e-tratamento> acessado em 20/08/2014

2.5. Epidemiologia

A leishmaniose é endêmica em regiões de clima tropical e subtropical, totalizando 98 países e três territórios nos cinco continentes, representando um problema de saúde pública em vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Tabela 2) (WHO, 2014; ALVAR *et al.*, 2012).

Quadro 2: Numero de casos e estimativas globais de incidência de leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)*

	Casos de LTA ocorrido/ ano	Dados de países a 5 anos	Estimativa anual de incidência de LTA	
América	66, 941	14/20 (70%)	187, 2	a 307, 800
África Sub-Saariana	155	5/15 (33%)	770	a 1500
África Oriental	50	0/6 (0%)	35,300	a 90,500
Mediterrâneo	85,555	17/26 (65%)	239,500	a 393,600
Oriente Médio a Ásia Central	61, 013	16/18 (89%)	226,200	a 416, 400
Sul da Ásia	322	2/2 (100%)	1900	a 3500
Total Global	214,036	53/87 (61%)	690,900	a 1,213,300

*Adaptado de Alvar *et al.*, 2012.

De acordo com Alvar (2012), são estimados 7.000 – 1.200.00 casos de LTA por ano no mundo, com cerca de um terço dos casos decorrentes em cada uma das três regiões, as Américas, a bacia do Mediterrâneo e Ásia.

Devido a inúmeras mudanças ambientais causadas pelo homem, bem como a urbanização, o desmatamento e o crescimento desordenado de cidades, observa-se a expansão da ocorrência de LTA, caracterizada pela transmissão da doença, antes restrita a áreas rurais e agora também presente nas zonas urbanas. Contribuem para a disseminação da doença, também, a constante migração de indivíduos, sendo que a forma tegumentar está presente entre as 10 doenças de pele que mais acometem turistas que retornam de países tropicais (PAVLI, 2010).

Os dez países com as contagens de casos mais elevado estimados, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos, respondem

por 70 a 75% da incidência global. No Brasil, a LTA tem ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões do país (ALVAR *et al*, 2012).

2.6. Formas Clínicas

Na LT, estudos demonstram que dias ou semanas antes do aparecimento da lesão cutânea, ocorre o aumento de gânglios linfáticos, próximo ao local de inoculação do parasita regredindo em algumas semanas. Em pacientes com úlceras cutâneas com mais de dois meses de duração, a linfadenopatia pode ser bem observada (CARVALHO, 2011).

Além da forma cutânea e da forma mucosa, outras duas formas clínicas de LT são bastante conhecidas: a cutânea difusa e a cutânea disseminada, consistindo, em ambas, múltiplas lesões, possuindo diferenças clínicas, histopatológicas e imunológicas (NEVES, 2008).

A leishmaniose cutânea difusa apresenta – se na forma de nódulos, não existindo resposta imune celular contra antígenos do parasita. A leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada por lesões acneiformes que podem se ulcerar e, histopatologicamente, há infiltrado eosinófilo ou linfoplasmocitário, com os parasitas podendo ou não ser detectados na lesão. A resposta imune é variável, enquanto na cutânea difusa o comprometimento da mucosa nasal não é observado, na forma disseminada esse envolvimento é muito frequente (ALMEIDA e SANTOS, 2011; CARVALHO, 2011).

Acredita-se que a ocorrência de leishmaniose clinicamente manifesta esteja na dependência de fatores inerentes ao parasita, da resistência natural do hospedeiro e da resposta imunológica. No homem, a propagação da doença, desde a lesão cutânea até o nariz, pode ocorrer por via linfática, hematogênica e raramente pelo contato direto da mucosa com a lesão cutânea (NEVES, 2008).

2.7. TRATAMENTO

2.7.1. Tratamento de Primeira Escolha

Os antimoniais pentavalente têm sido adotados há muito tempo para o tratamento de doenças parasitárias. Os compostos de antimoniais pentavalente são as drogas de primeira escolha pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tratar a LC. Nos países de língua francesa, espanhola e no Brasil, é utilizado a N-metilglucamina, Glucantime®, e nos países que tem como língua o inglês, o estibogluconato de sódio, Pentostam®, com a dose de 10 – 20mg/Kg/dia, por via parenteral, durante 20 dias (OLIVEIRA *et al.*, 2005; FREITAS – JUNIOR *et al.*, 2012).

Mesmo sendo fármacos de primeira escolha e desempenhando bons resultados no tratamento da leishmaniose, eles apresentam limites na eficácia contra o parasita, e algumas desvantagens, como: administração parenteral diária (exceto miltefosina, que é via oral e não é de primeira escolha), toxicidade, longo tempo de tratamento, necessidade de hospitalização, acompanhamento diário e efeitos colaterais, como febre, tontura, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, pirose, diarreia, dor abdominal, pancreatite, prurido, fraqueza, neuropatia periférica, cefaleia, palpitação, insônia, nervosismo, calafrio, edema, anemia, e erupções cutâneas (CIRMEMAN, 2008). Além de relatos de resistência das leishmaniasa esses fármacos e a maioria dos pacientes tratados apresentam alterações das enzimas pancreáticas e também dores abdominais (OLIVEIRA *et al.*, 2005)

O tratamento da LC pode ser local ou de forma sistêmica, dependendo de como a lesão está evoluindo, de qual espécie de *Leishmania* está envolvida, se ela pode se disseminar e quais implicações estéticas e funcionais ela poderá causar (OLIVEIRA *et al.*, 2005). As recomendações da OMS para o tratamento da LC usando antimoniais são as vias intralesional e intramuscular, dependendo da espécie e aspecto clínico (OMS, 2000).

Com o surgimento de novas terapias, tem sido relatado que as antimoniais pentavalentes estão sendo ameaçados devido a resistência dos parasitas (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2010), desfavorecendo seu uso, devido a grande interação do fármaco com a resposta imune do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.7.2. Tratamento de Segunda Escolha

O tratamento de segunda escolha é adotado quando não se obtém resposta satisfatória ao tratamento com o antimonial ou quando o paciente não pode fazer uso do mesmo. Esses fármacos recebem esse nome porque antigamente eram considerados mais propensos a causar efeitos tóxicos graves ou irreversíveis, como a insuficiência renal (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, esses fármacos, dentre eles, Pentamidina®, Anfotericina B®, Milteforan®, Paromomicina®, representados, principalmente, pelo isotionato de pentamidina e pela Anfotericina B, vem sendo reintroduzidos, com novas formulações ou mudanças na dosagem (REITHINGER *et al.*, 2007).

O isotionato de pentamidina é administrado por via parenteral e possui alta toxicidade, principalmente para idosos, cardiopatas e nefropatas, dificultando seu uso. Este é usado na América do Sul para tratar a LC, em especial quando está é causada por *L. guyanensis*, pois ela é pouco sensível aos antimoniais (REITHINGER *et al.*, 2007).

A anfotericina B tem ação leishmanicida reconhecida, principalmente, no tratamento da lesão mucosa e é indicada como primeira opção no tratamento de LC em gestantes ou com coinfeção *Leishmania*/HIV (REITHINGER *et al.*, 2007). Porém, apesar dos conhecidos efeitos terapêuticos da anfotericina B, a maioria dos pacientes tem algum efeito adverso, como febre, náuseas, vômitos, cefaléia, hipotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas (ROMERO *et al.*, 2003). Atualmente, a anfotericina B possui taxa de 97% de cura

com nenhum relato de recidiva. No entanto, tem se observado uma diminuição na sensibilidade e diversas recaídas em casos isolados (SCHUBACH *et al.*, 2005).

A Miltefosina foi originalmente desenvolvida como agente antineoplásico. Atua diretamente sobre as formas promastigotas das *Leishmanias*, de forma tóxica. Possui como efeito colateral vômitos e náuseas (ALMEIDA e SANTOS, 2011).

A paromomicina (PA) possui ação anti-leishmania quando usada no tratamento da leishmaniose visceral (SANTOS *et al.*, 2008).

3.0.Complexos Metálicos e Sais de Metal

O uso de complexos metálicos e sais de metal na medicina está se difundido no mundo todo, além de serem usados para diagnosticar diversas doenças. Esses complexos são bastante diversificados, e conhecer e entender como funciona o mecanismo de ação farmacológica deles é fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos, que podem vir a ser mais eficientes e seguros para o organismo humano (CHEN *et al.*, 2009).

Estão sendo usados complexos metálicos de ouro no tratamento de artrite, em especial a auranofina, de prata contra infecções antibacterianas, em especial a sulfadiazina, complexos de platina, cisplatina, contra câncer (CHEN *et al.*, 2009; OTT, 2009; KELLAND, 2007; HARTINGER *et al.*, 2008).

Desde a antiguidade, metais e derivados dos mesmos são utilizados com finalidades terapêuticas, e os experimentos com eles foram, provavelmente, realizados com base no conhecimento das propriedades tóxicas, e por conseguirem suprir determinados processos biológicos (CHEN *et al.*, 2009).

Na época do renascimento, europeus usavam cloro de mercúrio como diurético e, acabaram descobrindo o valor nutricional do ferro. Ainda podem ser citados como exemplo, o

uso de formulações de ouro como revigorante e no tratamento de tuberculos e o uso de nitrato de prata para tratar queimaduras e abscessos (MOYER, 1965).

Em 1965 ocorreu marco na química inorgânica medicinal, quando Barnett Rosenberg descobriu as propriedades antitumorais do cis $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, que é a cisplatina. E com essa descoberta, ocorreu um grande impulso nas buscas por novos compostos metálicos com propriedades farmacológicas diferentes (ZANG e LIPPARD, 2003).

Os compostos que possuem ouro tem recebido grande atenção por terem a capacidade de interromper o crescimento de células tumorais, fato que ocorra, possivelmente, pela inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), essencial ao mecanismo de proliferação de células cancerígenas. Complexos contendo paládio, por possuírem similaridades estrutural com complexos de platina, também podem ser agentes tumorais com elevado potencial, por terem, em certos casos, atividade *in vitro* semelhantes ou superiores a cisplatina (ZANG e LIPPARD, 2003).

De acordo com a OMS, as doenças infecciosas e parasitárias são responsáveis por um elevado número de enfermidades, e devido a elevada resistência de bactérias a antibióticos, o nitrato de prata (AgNO_3) voltou a ser utilizado, por tem ação antibacteriana. Devido a isso, o interesse no mesmo aumento significativamente nos últimos anos, mesmo com ele apresentando algumas desvantagens, como queda na concentração de íons de sódio e cloreto no sangue e elevada concentração de íons de prata e nos rins e músculos (MOYER, 1965).

Devido a essas desvantagens, estão sendo desenvolvidos novos composto de prata que possuem ação antimicrobiana, visando a liberação dos íons de prata $\text{Ag}(\text{I})$ de forma lenta e controlada. A sulfadiazina de prata a 1% ainda altamente usada no tratamento de queimaduras, de segundo e terceiros graus, devido a sua eficiente devido a ser menos solúvel e possui alta eficiência contra bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (BAKHTIAR e OCHIAI, 1999).

3.1.A prata e seu uso na medicina

A prata foi um dos três primeiros metais a serem descobertos pelo homem, junto com o ouro e o cobre. É um metal branco, brilhante, dúctil e maleável, que perde o brilho quando exposto ao ozônio (O₃), bom condutor de eletricidade e um elemento estável quando exposto ao ar e à água, podendo ser obtido através de extração direta de minério e como subproduto do resultado do refinamento de outros metais, como Au, Cu, Ni, Zn. O elemento 47 é um metal de transição pertencente ao grupo 11 da tabela periódica (MOYER *et al.*, 1965). Possui configuração eletrônica [Kr] 4d¹⁰5s¹, peso atômico de 107,86 g mol⁻¹ (ATKINS; JONES, 2005; SEGURA, 2014).

O uso da prata data de muito tempo atrás. De acordo com relatos, Alexandre, o Grande, (356-323 a. C.), assim como os venezianos usavam recipientes feitos de prata para manter vinho, água e vinagre salubres. Os pioneiros no durante a conquista do Oeste, depositavam moedas de prata dentro de garrafas com o mesmo fim (BERGAMINI & PAIVA, 2011).

Relatos de seu uso medicinal tem uma história longa, na Macedônia, eram usadas placas de prata sobre feridas para ajudar na cicatrização; na Grécia antiga, Hipócrates (460 – 370 a. C.) ensinava a seus discípulos sobre o uso da “flor de prata”, que consistia em um pó extrafino de prata, que curava feridas ulceradas; na época dos alquimistas, como Plínio (78 d. C.), Gerber (702 – 765 d. C.), Paracelso (1493 – 1541), utilizavam a prata para o tratamento de doentes mentais e epiléticos, pois acreditavam que a prata corresponderia a lua (macrocosmo) e a cabeça (microcosmo) e o uso da prata traria de volta a sanidades dos doentes mentais e o fim das crises epiléticas; na Idade Média, a prata era usada no tratamento de palpitações; já no século XVIII, o nitrato de prata tornou – se a melhor opção para tratar de feridas, úlceras e doenças de pele em geral, tendo seu primeiro relato com atividade antimicrobiana em 1869, pelo cientista Revelim; em 1881, o médico Carl Crede (1819 – 1882) foi o primeiro a

recomendar o tratamento com solução de 1% de nitrato de prata em olhos de recém – nascidos para evitar a cegueira, prática utilizada até os dias de hoje (Bergamini & Paiva, 2011).

Sua propriedade antimicrobiana e de seus compostos é a base principal de sua aplicação medicinal, desde o século XIX. A partir daí a prata teve diversas utilizações e seu enorme potencial para o tratamento de lesões foi sendo descoberto (MOYER *et al.*, 1965). Moyer *et al* (1965) foram, provavelmente, os primeiros a abordarem o uso tópico dela em feridas, desenvolvendo um tratamento eficaz contra queimaduras infectadas utilizando-se de um creme a base de nitrato de prata a 0,5%, sendo eficaz, também, contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus hemolyticus* sem causar resistência das cepas por conta da prata. Atualmente ela está presente em uma ampla gama de coberturas e pode se apresentar em duas formas:

- 1) Compostos/complexos: quando associada a um sal e produz a prata iônica (Ag^+), quando está em contato com fluidos de feridas ou soluções;
- 2) Elementar: quando está em forma metálica (Ag), também descrita como prata coloidal ou nanopartículas de prata.

Seu cátion ou íon carregado positivamente (Ag^+) é ativo contra uma grande variedade de patógenos bacterianos (HUGO 1992), fungos (WRIGHT *et al.*, 1999) e vírus (MONTES *et al.*, 1986) e esse poder antimicrobiano tem sido relacionado aos seus variados mecanismos de ação, como interferindo no metabolismo bacteriano, levando ao rompimento da parede da célula bacteriana e ligando – se ao seu DNA, inibindo assim a replicação e a possibilidade de desenvolver resistência (WHITE, 2001).

Os complexos de prata são de caráter bastante interessante, já que sua atividade antimicrobiana e outras propriedades tem a possibilidade de serem manipuladas, variando assim o número e tipo de ligantes que podem ser coordenados ao seu íon, e, quando usados

ligantes ativos biologicamente, estes podem aumentar a eficiência de um agente terapêutico (SEGURA, 2014).

Por possuir uma coordenação rica, pode – se encontrar na literatura compostos com diversos tipos de coordenação usando a prata. (ATKINS, 2010). Escolher de forma adequada o ligante para ser usado na coordenação com o íon da prata torna a diversidade da coordenação maior, que podem, inclusive, ajudar na estabilização da estrutura do complexo (BARREIRO, 2014).

Ainda não se sabe muito sobre o mecanismo de ação dos íons de prata, tanto que sua ação é atribuída ao fato de interferir no crescimento da célula por três modos distintos. 1) inibindo as funções de transporte na parede celular; 2) interrompendo o metabolismo da célula, mudando a estrutura das enzimas, atuando sobre as mesmas; 3) inibindo a divisão celular, com relação direta com o DNA (PERCIVAL *et al.*, 2005).

A prata (I) é o estado de oxidação com maior importância, e também o mais comum, porém ainda tem muito que ser estudada, com uma ampla diversidade de compostos (ATKINS, 2010).

Um estudo realizado em queimaduras tratadas com uma cobertura com prata nanocristalina demonstrou que após cinco dias de uso a mesma causou argíria com significativa elevação nas concentrações sanguíneas (107ng/g) e urinárias (28ng/g). Quando o uso foi descontinuado as concentrações se normalizaram em 90 dias (LANDSDOWN & WILLIAMS, 2004)

De acordo com Russell & Hugo (2004) e Demling & DeSanti (2001), a forma iônica da prata é um potente agente microbiocida em concentrações tão baixas quanto de 0,001 a 0,06 ppm (partes por milhão), não sendo preciso uma alta concentração de prata para obter efeito bactericida. Ovington (2004) ressalta que a maioria dos estudos sobre citotoxicidade da prata são feitos *in vitro*, em condições muito diferentes daquelas encontradas em uma ferida,

portanto deve-se considerar que o efeito observado *in vivo* pode não corresponder diretamente à situação clínica.

Estudos realizados com *L. tropica* demonstraram que, quando expostas a nanopartículas de prata, os valores de proliferação e atividade metabólica desses parasitas diminuiu (RAHI *et al.*, 2013; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011). O estudo de Job e colaboradores (2014) com *L. braziliensis*, comprovou que, o uso de borracha natural com membranas de nanopartículas metálicas de prata, quando colocado no meio em que se encontra o parasita, tal membrana com as nanopartículas são capazes de fazer a separação de células, eliminando os parasitas que não terminaram a metacicloênese, fase estacionária dos parasitas, onde e começam suas transformações farmacológicas, e são altamente infecciosos para o hospedeiro, e as células imaturas, que não causam a doenças, permanecem vivas e são mantidas intactas, gerando uma biomassa parasitária, que, segundo o autor, propicia um futuro estudo para uma vacina contra a leishmaniose.

4.0.OBJETIVOS

4.1- Geral

Avaliar a atividade *in vitro* anti-leishmania de complexos metálicos de prata contra espécies causadoras da forma cutânea da Leishmaniose determinando suas concentrações efetivas em diferentes tempos de exposição do parasita aos complexos.

4.2- Específicos

- Avaliar a atividade anti-leishmania dos complexos metálicos de prata contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) guyanensis*;
- Estudar o efeito dos complexos metálicos de prata contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, interiorizadas em macrófagos de linhagem;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos complexos metálicos de prata em macrófagos de linhagem não infectados;
- Determinar a IC₅₀ (concentração efetiva à 50%) dos complexos de prata quanto ao potencial anti-leishmania;

5.0.MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi executado no Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, na Coordenação de Pesquisas em Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS), no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob a orientação da Dra. Antonia Maria Ramos Franco e da Dra. Claudia Dantas Comandoli Wyrepkowski e no Instituto per l’Energetica e le Interfasi, IENI, CNR, Pádua, Itália, com colaboração da Dra. Marina Porchia, sob o consórcio do Projeto Vaikutus (FP7-PEOPLE-IRES-2011-295262).

5.1. Preparo de massa parasitária

Foram utilizadas para os estudos de avaliação *in vitro* as espécies: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

Os parasitas foram cultivados em meio bifásico NNN (McNeal, Novy e Nicolle) (LOUREIRO *et al.*, 1998) por sete dias em incubadora a 25°C e, em seguida, transferidos para meio líquido, com 5 mL meio Schenider completo com SFBi (Soro Fetal Bovino Inativado). Foi acrescido meio líquido a cada dois dias, com o dobro da quantidade de Schenider + SFBi, durante um período de duas semanas para expansão das amostras em cultivo.

6.0.COMPOSTOS QUÍMICOS

No presente estudo, foram realizados os testes pré-clínicos *in vitro* com dois complexos solúveis de prata e seus respectivos ligantes, [Ag(PTA)₄]BF₄, onde foi utilizada a

nomenclatura Ag₁, e [Ag(PPh)₃(HBPz)₃], onde foi utilizada a nomenclatura Ag₂. A síntese química dos compostos foi realizada pela equipe do Dr. Francesco Tisato e Dra. Marina Porchia, no Instituto per l'Energetica e le Interfasi, IENI, CNR, Pádua, Itália, Conselho Nacional de Pesquisas da Itália – Pádua (CNR, PADUA, ITALIA). A atividade dos complexos e seus ligantes foram estudados em comparação com o Pentacarinat®.

7.0. Atividade *in vitro* anti-leishmania em formas promastigotas

7.1. Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária

Foram utilizadas as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147), mantidas e criopreservadas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS, INPA. Os parasitas foram cultivados em meio Schneider (Himedia) completo, suplementado com 10% de SFBi para os bioensaios e criopreservação.

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* utilizadas nos bioensaios *in vitro* foram mantidas e cultivadas em meio Schendier suplementado com 10% de SFBi, e mantidos em estufa à 24° C.

7.1.1. Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmanias* pp.

Para determinar o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania*, foram inoculados 10⁶ promastigotas/ mL em meio de cultura Schneider completo e incubados em estufa a 25° C por sete dias, em duplicatas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas, diluídas em solução

fixadora de ISOTON (ácido cítrico 0,005M, NaCl 0,12M, formaldeído 0,5% pH 7,2) e quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400X. A média aritmética das duas contagens foi usada para calcular o número de parasitas em 1,0 mL de cultura. O cálculo foi feito de acordo com a fórmula: número de parasitas/mL = contagem de parasitas viáveis no hemocitometro da câmara de Neubauer x o valor da diluição x 10^4 . A curva foi construída utilizando o software GraphPadPrism 6®.

7.1.2. Determinação da atividade anti-leishmania dos complexos solúveis de prata – Ensaios *in vitro*

A atividade anti-leishmania dos compostos foi avaliada pela inibição do crescimento e pela mortalidade das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Antes de cada experimento, foi observada a motilidade flagelar e a morfologia dos parasitas.

Na realização do bioensaio, as formas promastigotas foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos, lavadas em solução salina estéril, diluídas e contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para obtenção da concentração parasitária de 2×10^4 células/ mL.

As amostras dos dois complexos solúveis de prata foram diluídas em DMSO e meio Schneider. Foram filtradas em filtro com membrana com poros de 0,22 μm , em condições estéreis, para obter a solução dos complexos na concentração de 160 μM /mL.

O controle negativo foi constituído de meio Schneider completo e parasitos (10^4)/ mL e DMSO nas concentrações de 4% a 0.24%. Para o controle positivo foi usado Pentacarinat® nas concentrações de 25 μg /mL a 3,125 μg /mL.

A atividade das amostras, nas concentrações de 160 – 10 μM /mL, foram avaliadas pela inibição do crescimento e mortalidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.)*

guyanensis, após incubação na presença das mesmas nos períodos de 24, 48 e 72 horas, na temperatura de 25° C em estufa.

Para avaliar a viabilidade celular foi empregado o método de contagem nos períodos de 24, 48 e 72 horas de células vivas (utilizando o corante Azul de Tripán, 10µL, e avaliando a motilidade celular) em câmara de Neubauer em microscópio óptico, aumento de 400 vezes. (PEREIRA *et al.*, 2010).

7.1.3. Avaliação da viabilidade parasitária utilizando o método colorimétrico MTT

O ensaio colorimétrico usando o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), é um método que também pode ser aplicado para testar a viabilidade em formas promastigotas de *Leishmania* sp. No presente estudo a técnica foi utilizada em promastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Como controle negativo, foram utilizados parasitos na ausência dos complexos de prata na presença do solvente DMSO. Para a avaliação da viabilidade parasitária pelo método do MTT, as diluições dos complexos foram adicionadas aos poços contendo meio Schneider completando um volume final de 100 µL por poço. Foi adicionado ao poço 100 µL de promastigotas de *Leishmania* (2×10^4 cels/ mL). As placas com as promastigotas foram incubadas em estufa a 25°C, durante 24, 48 e 72 horas, na presença dos complexos de prata e na ausência de qualquer composto, como controle. Após o período de incubação, foi adicionado 10µL de MTT (Roche®) em cada poço, e as placas foram novamente incubadas por 4 horas em estufa a 25° C. Após este período, foram adicionados 100 µL de solução de solubilização e incubadas por mais 24 horas a 25°C. Passado o tempo de incubação as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro

7.2. Atividade anti-leishmania *in vitro* em amastigota

7.2.1. Obtenção dos macrófagos murinos e manutenção das células

Para Os ensaios *in vitro* com as formas amastigotas, foram usados macrófagos de linhagem J774, foram mantidos no laboratório, criopreservados, e, posteriormente, descongelados e cultivados em meio RPMI 1640 inicialmente com 10% de SFBi e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca de meios para manutenção dos macrófagos foi realizada a cada dois dias (PAVAN et al, 2010).

7.2.2. Infecção dos macrófagos com *Leishmania* spp.

Os macrófagos foram incubados em placa de poços em uma concentração de 10⁵ células/mL, em meio Schneider completo (Himedia) em estufa à 37° C por 24 horas. Após este período, os macrófagos foram infectados com 10⁵ promastigotas/ mL por no máximo de quatro horas. As espécies de leishmania avaliadas foram *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Em seguida, os poços foram lavados com Schneider incompleto para a remoção dos promastigotas não interiorizados.

7.2.3. Determinação da atividade anti-leishmania dos complexos solúveis de prata em amastigotas interiorizados em macrófagos – Ensaio *in vitro*

Os macrófagos infectados com promastigotas foram incubados na presença dos compostos que apresentaram maior potencial de inibição e atividade anti-leishmania contra *L. (L.)*

amazonensis e *L. (V.) guyanensis* no bioensaio promastigota *in vitro*. Os compostos diluídos foram adicionados aos poços, que possuíam uma lamínula redonda dentro, utilizando a maior concentração testada em promastigotas. Após duas horas de incubação em estufa a 37° C, os poços foram lavados com meio Schneider incompleto e adicionados a novo meio de cultura Schneider suplementado com 10% de SFBi) e incubados novamente por mais 24 horas nas mesmas condições. Após esse período, as lamínulas de vidro foram removidas, e as células infectadas foram coradas utilizando método panótico adaptado para testes utilizando macrófagos. Foi avaliado o número de macrófagos infectados. A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico. O controle negativo corresponde às células infectadas com os parasitos.

7.2.4. Ensaios de citotoxicidade dos complexos de prata sobre macrófagos murinos de linhagem (MTT)

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando macrófagos de linhagem J774. As células foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em meio Schneider completo. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer. O número de células/mL da amostra foi estimado como a média aritmética de duas contagens dos quatro quadrantes X o inverso da diluição da amostra X 10⁴. Após quantificação, as culturas foram incubadas em placa de 24 poços volume de células ajustado para 1x10⁵ macrófagos por poço em um volume final de 100µL de meio Schneider completo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 4 horas, para aderência dos macrófagos aos poços. Após o período de incubação, as culturas foram visualizadas em microscópio invertido para observação dos macrófagos aderidos e os poços

foram lavados 3 vezes com meio Schneider incompleto para remover possíveis células não aderentes.

Após as lavagens para retirada das células não aderidas e o esgotamento dos poços, os macrófagos aderidos à placa foram incubados na presença dos dois complexos de prata, diluídos em um volume final de 100µL de meio Schneider completo. Como controle negativo do experimento, macrófagos aderidos serão incubados na presença apenas de meio Schneider completo que foram expostos à solução fixadora ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5%, pH 7,2).

As culturas permaneceram expostas aos compostos durante 24 horas, incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após os períodos de incubação, foram adicionados aos poços 10µL da solução MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Roche®) a 5mg/ mL (50 µg/poço). As placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, foi adicionado 100µL de solução de solubilização para solubilizar os cristais de formazan gerados, e posteriormente as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, sob a absorvância de 590 nm.

8.0.RESULTADOS

Os bioensaios *in vitro* abrangeram a etapa inicial dos estudos dos complexos metálicos, buscando o composto metálico mais promissor no tratamento da LTA, como uma nova alternativa de tratamento da doença. As formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* foram submetidas à ação de complexos metálicos de prata (Ag_1 e Ag_2), sendo o método de averiguação do potencial dos complexos, feito pela contagem de parasitas vivos e viáveis, durante o período de 24h, 28h, 72h, em cinco concentrações diferentes (160 μ M; 80 μ M; 40 μ M; 20 μ M; 10 μ M), por dois métodos, contagem manual e colorimétrico (MTT).

8.1.Curva de crescimento de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

O crescimento do parasita segue uma curva que depende da sua espécie e das condições que é imposto, tais como o meio de cultura e a temperatura de incubação. Para a realização da curva de crescimento, foi utilizada uma cultura de quarta passagem após isolamento de hamsters infectados com *L. (V.) guyanensis*.

Foi observado um aumento no número de parasitas a partir do terceiro dia, sendo, provavelmente a fase log do crescimento do parasita, apresentando novo aumento do crescimento no quinto dia. A partir do sétimo dia, observamos uma queda brusca no número de parasitas, consistindo na fase de declínio do crescimento. Para a realização dos bioensaios, foram utilizados parasitas no quinto dia de crescimento (Figura 4).

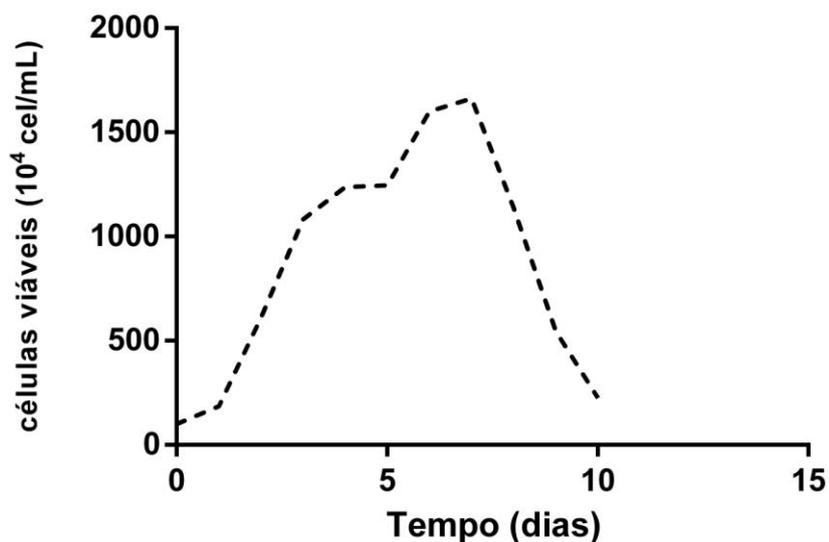


Figura 4: Curva de crescimento de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) em meio Schneider completo.

8.2. Curva dos controles positivo (Pentacarinat®), negativo (DMSO) e negativo (meio de cultivo Schneider completo acrescido de parasitas)

Os controles também foram avaliados no período de tempo em que foram realizados os bioensaios. Os testes foram realizados em triplicata, sendo tirada a média de cada concentração e construídos os gráficos. Para o controle positivo, foi utilizado Pentacarinat®. É uma droga que já encontra-se na forma trivalente (SB^3), atuando nos parasitas de forma direta, sem precisar ser metabolizada por processos biológicos. Ela apresentou melhor atuação nas duas maiores concentrações, 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 12,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$. A concentração de 6,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresenta ação moderada, e as duas últimas concentrações da substância apresentaram elevado número de promastigotas viáveis (Figura 5).

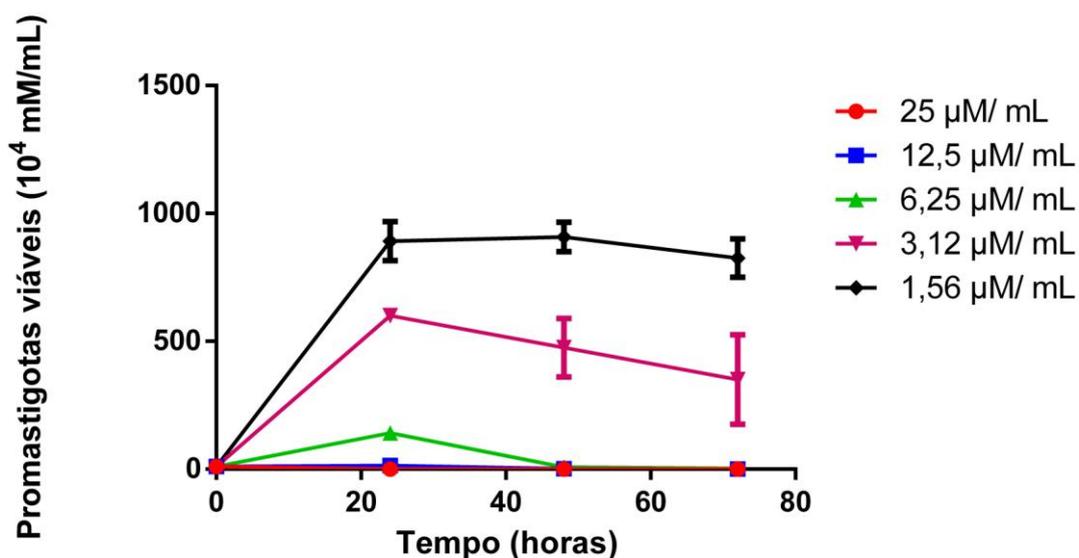


Figura 5: Curva do controle positivo (Pentacarinat®) sobre formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Para compor um dos controles negativos, foi usado o DMSO (Dimetil sulfóxido), com a concentração inicial de 4%, a partir daí, sendo então realizada diluição seriada, até a concentração de 0,25 µM/ mL. O DMSO é um solvente, no qual os complexos metálicos foram dissolvidos. Ele foi escolhido como um dos controles negativos, para sabermos se a ação que os complexos metálicos tiveram foi oriunda dos mesmos ou se o DMSO atuava de alguma forma. De acordo com o gráfico, (Figura 6) o DMSO não possui ação anti-leishmania, apresentando elevados números de parasitas viáveis em todas as cinco concentrações testadas.

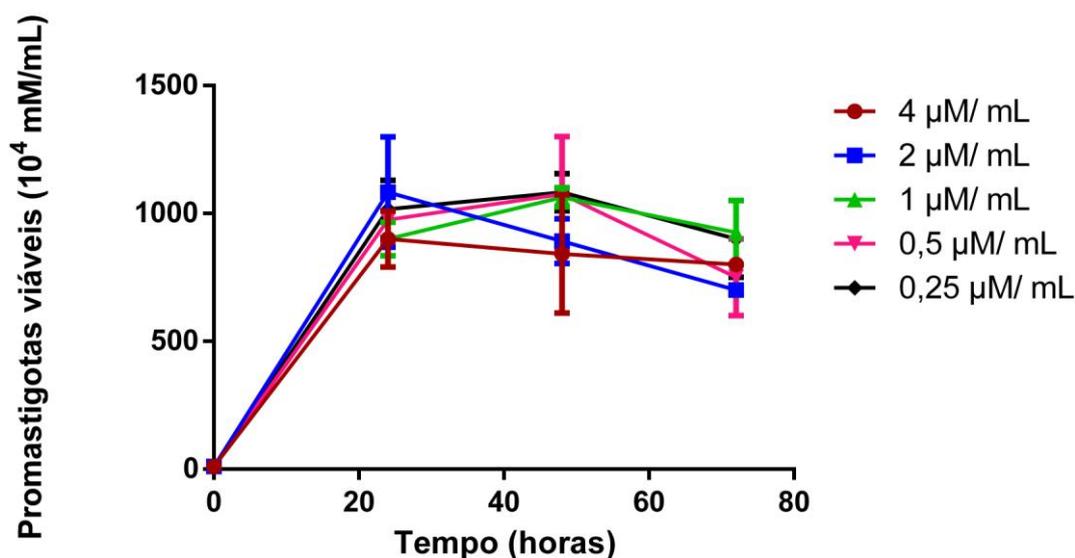


Figura 6: Curva do controle negativo (DMSO) sobre formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

A curva de crescimento somente com Schneider e parasitas (Figura 7) compara a atuação da Pentacarinat® e do DMSO. Podemos observar, no período de 24h, os parasitas estão na fase log, apresentando crescimento, visto no período de 48h, com maior quantidade de parasitas viáveis, tendo, no período de 72h, o declínio dos parasitas.

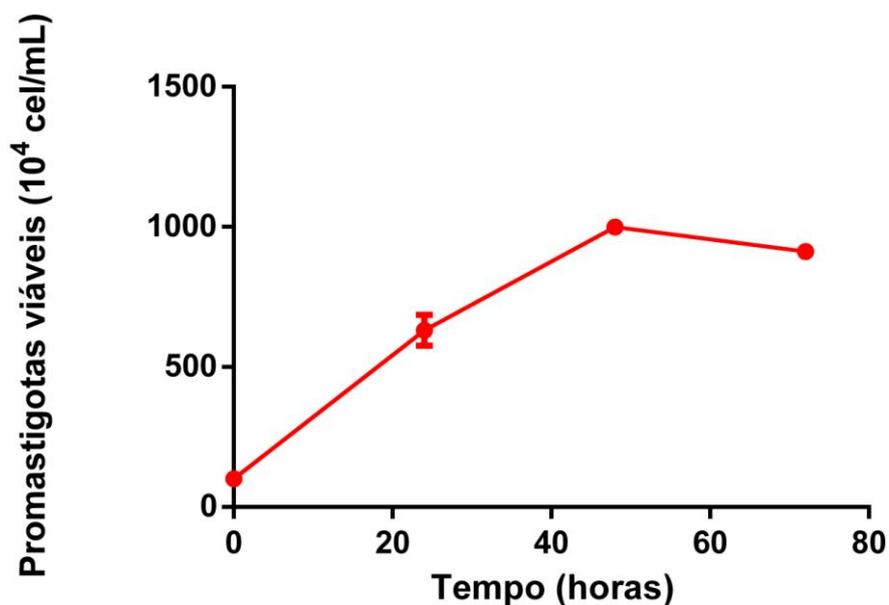


Figura 7: Curva de crescimento do controle negativo, composto por meio Schneider e parasita.

8.3. Atividade de complexos metálicos frente às formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, usando o método de contagem manual.

Foram testados dois complexos metálicos, Ag₁ e Ag₂ em cinco concentrações diferentes, (160µM; 80µM; 40µM; 20µM; 10µM), frente às formas promastigota de *L. (V.) guyanensis*.

Os valores estipulados para o EC₅₀ foram de: <10, considerado altamente ativo, entre 10 – 30 como ativo, entre 30 – 50 moderadamente ativo, >60 não ativo.

Como apresentado na Tabela 3, Ag₁ foi considerado não ativo, nos três períodos estudados, com EC₅₀ > 60 µM/mL, quando comparado com o controle positivo, Pentacarinat®. Ag₂ apresentou – se moderadamente ativo nos períodos de 24h, com EC₅₀ 43,32µM/mL, e em 48h, com EC₅₀ de 57,69 µM/ mL. Já no período de 72h, apresentou EC₅₀ <60 µM/mL, não sendo considerada ativa, em comparação com a Pentacarinat®.

Tabela 1: Valores de EC₅₀ da atividade dos complexos Ag₁, Ag₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Substância	Valores de EC ₅₀ / Tempo de incubação		
	24h	48h	72h
Ag1	62,76 ± 37,50	64,29 ± 37,69	78,34 ± 48,86
Ag2	43,32 ± 45,23	57,69 ± 63,97	63,93 ± 73,58
Pentacarinat®	24,62 ± 26,54	10,85 ± 35,79	10,13 ± 50,61

Quando testado, o complexo metálico Ag₁ contra as formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis*, usando o método de contagem manual, através do gráfico, (Figura 8), observamos que todas as concentrações apresentaram elevados números de parasitas viáveis nos três períodos estudados, de 24h, 48h e 72h.

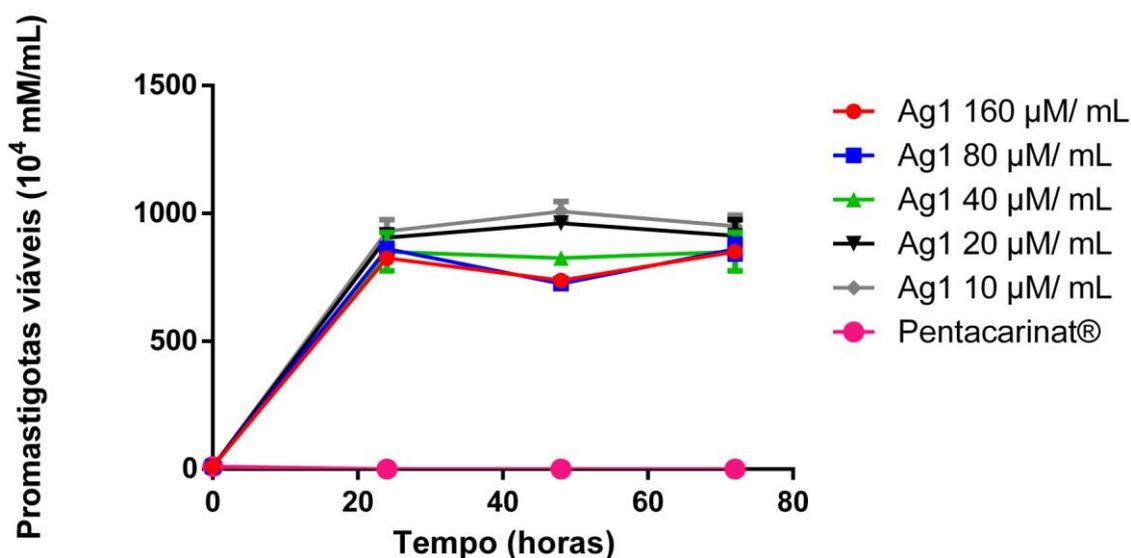


Figura 8: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_1 , $Ag(PTA)_4BF_4$, em comparação Pentacarinat®

O complexo metálico Ag_2 , quando testado contra as formas promastigota de *L. (V.) guyanensis*, usando o método de contagem manual, apresentou através o gráfico (Figura 9), menores quantidades de parasitas viáveis na concentração de 160 $\mu M/ mL$, nos três períodos estudados, porém, com valores ainda maiores quando comparado com o controle positivo com Pentacarinat®. As demais concentrações apresentaram quantidade de parasitas viáveis maiores que o controle positivo.

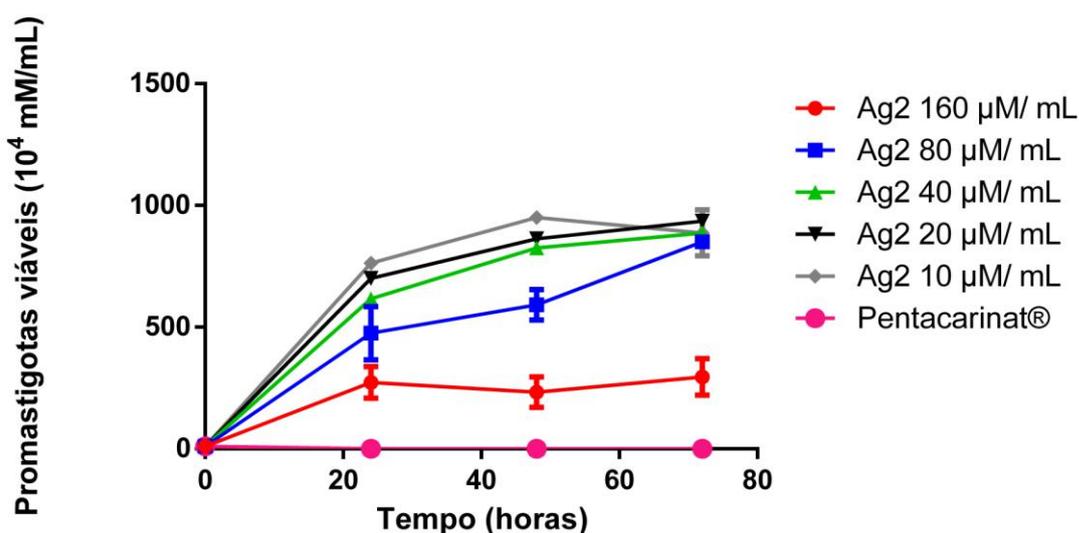


Figura 9: Atividade anti – Leishmania do complexo de prata Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$, em comparação Pentacarinat®

8.4. Atividade de complexos metálicos frente às formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, usando o método MTT

O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um teste usado para determinar a viabilidade das células. Quando incubado com células vivas, esses tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, mudando de um composto amarelo, para azul escuro/ roxo (cristais de formazan). Este teste foi primariamente sugerido por Mossman (1983). Os dois complexos metálicos também foram testado pelo método colorimétrico, MTT.

Os valores estipulados para o EC₅₀ foram de: <10, considerado altamente ativo, entre 10 – 30 como ativo, entre 30 – 50 moderadamente ativo, >60 não ativo.

De acordo com a Tabela 4, Ag₁ não apresentou atividade anti-proliferativa nem anti-leishmania frente às formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis*, tendo seus valores de EC₅₀ todos >60 µM/ mL, nos três períodos de tempo estudados. Já Ag₂, quando testado, não apresentou atividade no período de 24h, com valor de EC₅₀ >60 µM/mL. Porém, no período de 48h, a quantidade de parasitas viáveis apresentou queda, mas inda sem ter valor significativo, correspondente a atividade anti-proliferativa e anti-leishmania, com valor de EC₅₀ 82,62 µM/mL. Já no período de 24h, Ag₂ apresentou mais uma queda no número de parasitas viáveis, com valor de EC₅₀ de 63,82 µM/mL

Tabela 2: Valores de EC₅₀ da avaliação da atividade do complexo Ag₁, Ag₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* utilizando o método MTT

Substância	Valores de EC ₅₀ / Tempo de incubação		
	24h	48h	72h
Ag1	204,6 ± 0,060	298,41 ± 0,029	369,86 ± 0,032
Ag2	116,92 ± 0,077	82,62 ± 0,035	63,82 ± 0,059
Pentacarinat®	81,54 ± 0,053	60,42 ± 0,020	58,10 ± 0,040

Quando testado utilizando o método do MTT com complexo metálico Ag_1 , observamos através do gráfico (Figura 10) que no período de 24h, todas as concentrações apresentaram elevado número de parasitas viáveis, todas próximas entre si. No período de 48h, a concentração de 160 $\mu M/mL$ apresentou uma queda na quantidade de parasitas viáveis, porém, no período de 72h, tem – se novamente o aumento do número de parasitas. A concentração de 80 $\mu M/mL$ apresentou estabilidade nos três períodos estudados, com números elevados de parasitas viáveis. As demais concentrações apresentaram crescente número de parasitas.

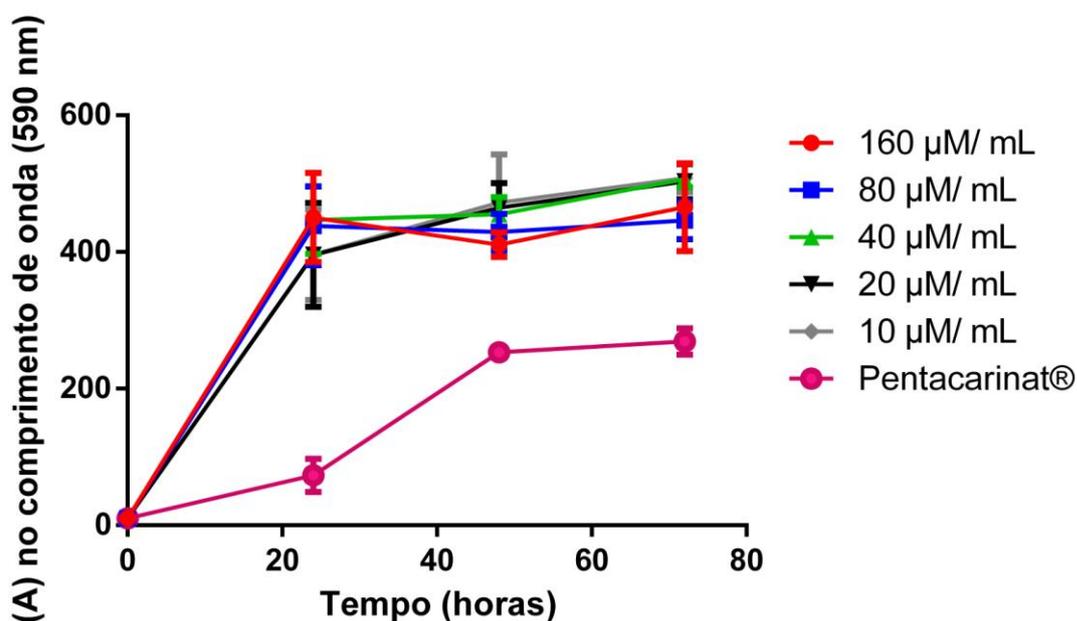


Figura10: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_1 , $Ag(PTA)_4(BF)_4$, utilizando o método MTT

O complexo metálico Ag_2 , quando testado com o método MTT, foi observado no gráfico (Figura 11), todas as concentrações apresentaram grande número de parasitas viáveis no período de 24h. No período de 48h, houve uma diminuição no número de parasitas viáveis em todas as concentrações, sendo as concentrações de 160 $\mu M/mL$ e 80 $\mu M/mL$ com as menores quantidades de parasitas viáveis. No período de 72h, a concentração de 160 $\mu M/mL$ e 80 $\mu M/mL$ continuaram apresentando queda no número de parasitas, sendo a concentração 160

$\mu\text{M}/\text{mL}$, nesse período no gráfico, apresentando valores similares ao do Pentacarinat® de As demais concentrações apresentaram constância no número de parasitas viáveis entre os períodos de 48h e 72h, porém, com quantidades muito elevadas.

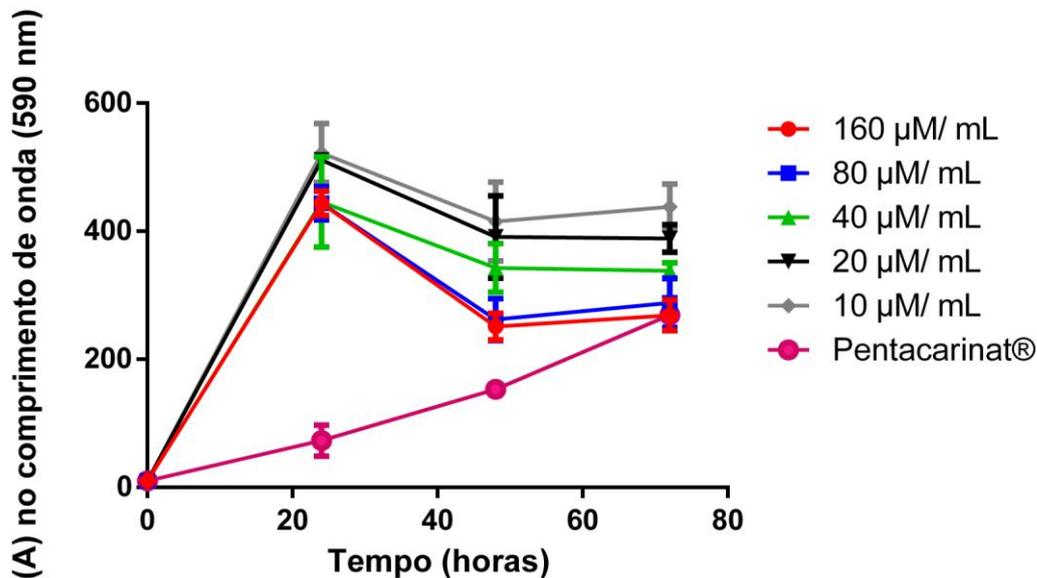


Figura 11: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_2 , $\text{Ag}(\text{PPh})_3(\text{HBPz})_3$, utilizando o método MTT.

8.5. Curva de Crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Na curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis*, foi possível observar um aumento no número de parasitas a partir do terceiro dia, elevando novamente no sexto dia, sendo este, o início da fase estacionária. A partir do oitavo dia, podemos observar a fase de declínio, com diminuição do número de parasitas (Figura 12).

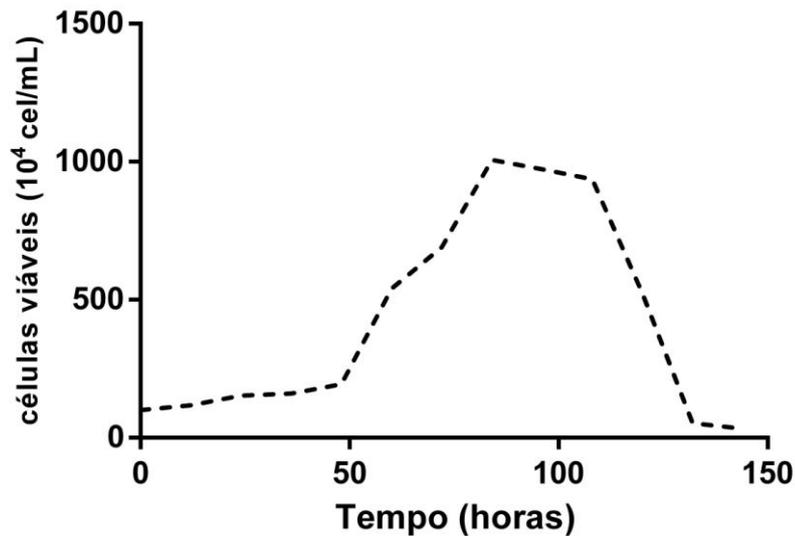


Figura 12: Curva de crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/2009/IM5584) em meio Schneider completo

8.6. Curva dos controles positivo (Pentacarinat®), negativo (DMSO), negativo (meio de cultivo Schneider acrescido de parasitas)

Assim como para *L. (V.) guyanensis*, para *L. (L.) amazonensis* foram feitas curvas de crescimento dos parasitas quando submetidas à ação de Pentacarinat®, DMSO e somente o meio Schneider.

Quando submetidos à ação de Pentacarinat®, podemos observar que nas concentrações de 25µg/ mL e 12,5 µg/ mL apresentaram baixos números de parasitas vivos e viáveis somente no período de 24h, seguindo da morte dos mesmos nos outros dois períodos estudados, 48h e 72h. As demais concentrações apresentaram crescente número de parasitas viáveis, conforme a concentração da Pentacarinat ® diminuía no meio (Figura 13)

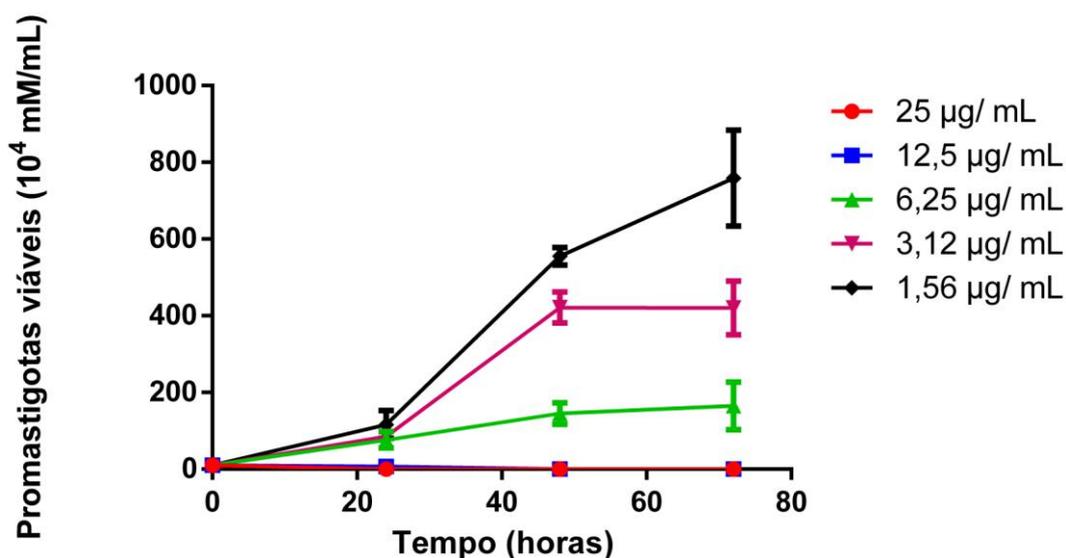


Figura 13: Curva do controle positivo (Pentacarinat®) sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Um dos controles negativos foi composto pelo o DMSO (Dimetil sulfóxido), com concentração inicial de 4 µM/ mL, sendo realizada diluição seriada até a concentração de 0,25µM/ mL. É um solvente, no qual os complexos testados foram dissolvidos. Ele foi escolhido como um dos controles negativos, para sabermos se a ação que os complexos metálicos tiveram foi oriunda dos mesmos ou se o DMSO atuava de alguma forma. De acordo com o gráfico, (Figura 14) o DMSO não apresentou atividade anti-leishmania, apresentando poucos parasitas viáveis no período de 24h, devido a pouca massa parasitária no início do bioensaio. Os outros dois períodos estudados, 48h e 72h, apresentaram números elevados de parasitas viáveis.

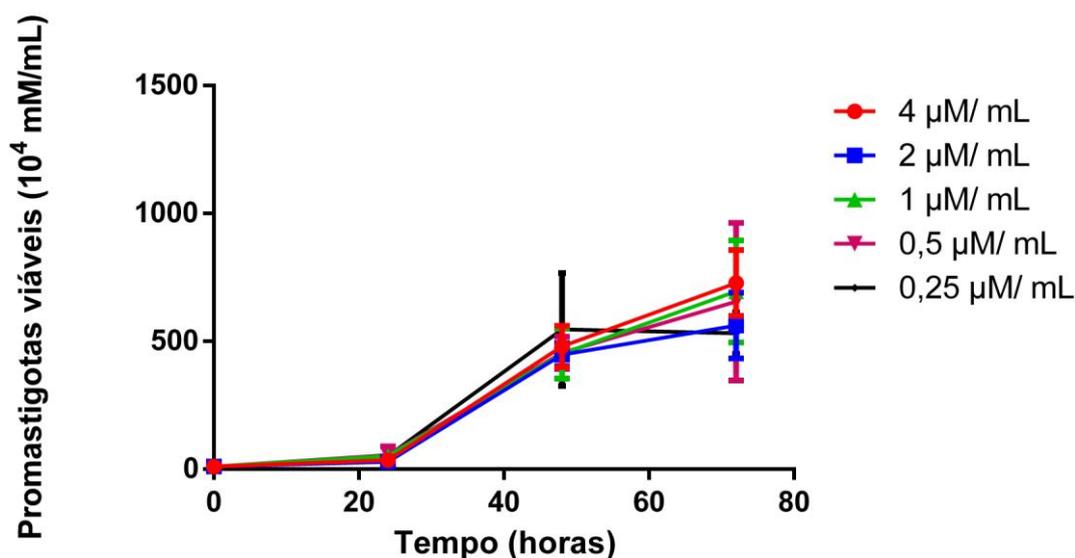


Figura 14: Curva do controle negativo (DMSO) sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

A curva de crescimento do controle negativo com (Meio Schneider e parasita) (Figura 15) compara a ação da Pentacarinat® e do DMSO. Pode ser observado um aumento crescente do número de parasitas viáveis, seguindo a linha de tempo dos períodos estudados.

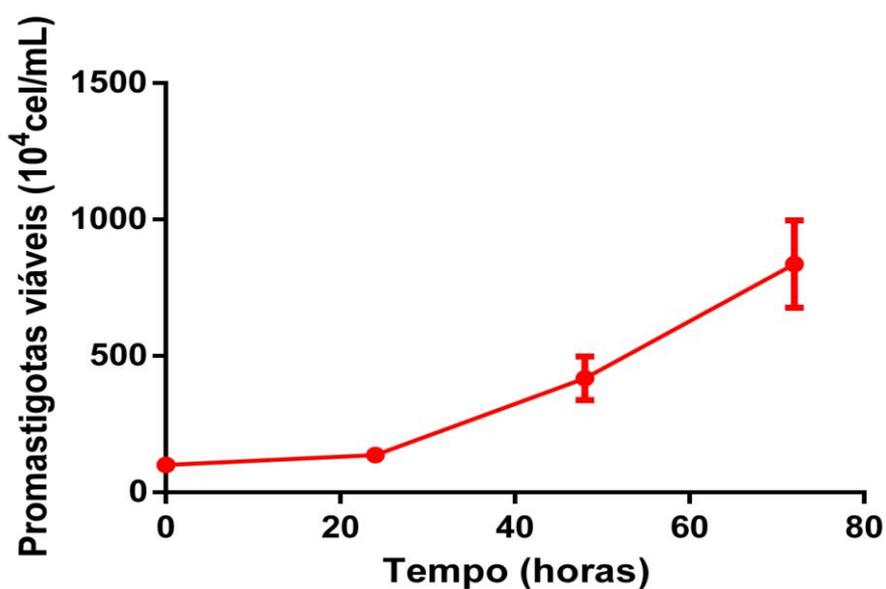


Figura 15: Curva de crescimento do controle negativo, composto por meio Schneider e parasita.

8.7. Atividade de complexos metálicos frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* usando o método de contagem manual

Foram testados dois complexos metálicos, (Ag₁ e Ag₂), em cinco concentrações, (160µM; 80µM; 40µM; 20µM; 10µM), contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Os valores estipulados para o EC₅₀ foram de: <10, considerado altamente ativo, entre 10 – 30 como ativo, entre 30 – 50 moderadamente ativo, >60 não ativo.

O complexo Ag₁, de acordo com a Tabela 5 apresentou – se ativo somente no período de 24h, EC₅₀ 16,46, quando comparado com Pentacarinat®, EC₅₀ 14,29 µM/mL. Nos períodos de 48h e 72h não apresentou atividade anti-proliferativa nem anti-leishmania, com EC₅₀>60 µM/mL, 91,23 µM/mL e 92,02 µM/mL, respectivamente. O complexo Ag₂ mostrou – se ativo nos períodos de 24h, com EC₅₀ 15,67 µM/mL, em 48h, EC₅₀ de 20,76 µM/mL, e em 72h, onde apresentou o melhor resultado dos três períodos estudados, com EC₅₀ de 14,53 µM/mL

Tabela 3: Valores de EC₅₀ da avaliação da atividade do complexo Ag₁, Ag₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Substância	Valores de EC ₅₀ / Tempo de incubação		
	24h	48h	72h
Ag1	16,46± 56, 23	91,23 ± 131,20	92,02 ± 128,10
Ag2	15,67 ± 49,73	20,76 ± 102,29	14,53 ± 68,69
Pentacarinat®	14,29 ± 46,14	18,28 ± 98,06	51,48 ± 88,28

Quando testado, o complexo metálico Ag₁ contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, usando o método de contagem manual, através do gráfico, (Figura 16), observamos que todas as concentrações apresentaram baixos número de parasitas viáveis no período de 24h. A maior concentração, de 160 µM/ mL, manteve esse baixo número de

parasitas viáveis nos outros dois períodos de tempo estudados, 48h e 72h, porém ainda maiores que o controle positivo com Pentacarinat®. As outras concentrações apresentaram números crescentes de parasitas viáveis nos outros dois períodos de tempo estudados, 48h e 72h.

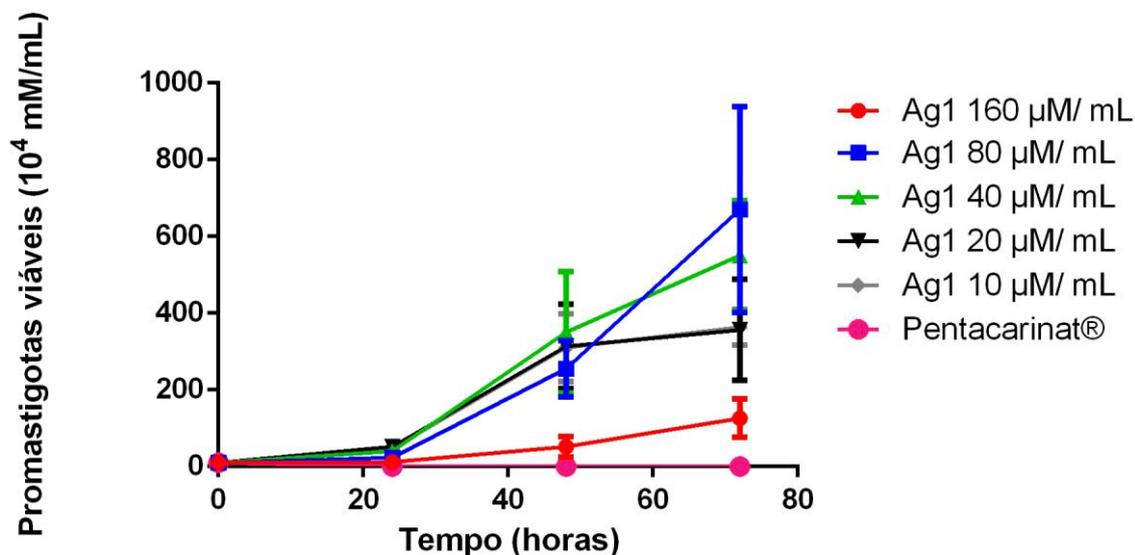


Figura 16: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag₁, Ag(PTA)₄(BF)₄ em comparação com Pentacarinat®

O complexo metálico Ag₂, por sua vez, mostrou, no gráfico (Figura 17) bons resultados nas concentrações de 160 µM/mL e de 80 µM/mL, semelhantes ao controle positivo com Pentacarinat®, nos três períodos de tempo estudados. As demais concentrações apresentaram resultados próximos do controle positivo somente no período de 24h, tendo aumento significativo nos outros dois períodos de tempo estudados, 48h, e 72h.

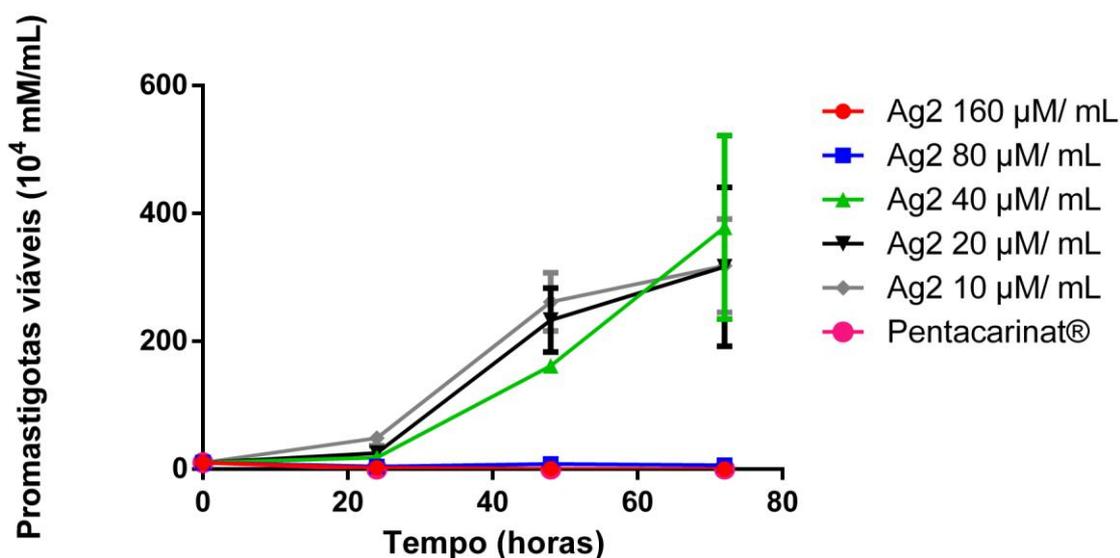


Figura 17: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag₂, Ag(PPh)₃(HBPz)₃, em comparação com Pentacarinat®.

8.8. Atividade de complexos metálicos frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, usando o método MTT

Os complexos Ag₁ e Ag₂ foram testados também pelo método colorimétrico do MTT. Os valores estipulados para o EC₅₀ foram de: <10, considerado altamente ativo, entre 10 – 30 como ativo, entre 30 – 50 moderadamente ativo, >60 não ativo.

Os dois complexos apresentaram ativos nos três períodos estudados. Ag₁ apresentou atividade no período de 24, com EC₅₀ 11,35 µM/mL. No período de 48h apresentou – se moderadamente ativo, com EC₅₀ de 36,45 µM/mL Já no período de 72h apresentou – se moderadamente ativo frente às formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, com valores de EC₅₀ 49,25 µM/mL. Ag₂ apresentou – se no período de 24h, com valor de EC₅₀ de 12, 69 µM/mL. Nos período de 48h e 24h, apresentou – se de forma moderadamente ativa, com valores de EC₅₀ 36,30 µM/mL e 44,41 µM/mL, respectivamente.

Tabela 4: Valores de EC₅₀ da avaliação da atividade do complexo Ag₁, Ag₂ e Pentacarinat® frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania)amazonensis* pelo método MTT

Substância	Valores de EC ₅₀ / Tempo de incubação		
	24h	48h	72h
Ag1	11,35 ± 0,008	36,45 ± 0,059	49,25 ± 0,023
Ag2	12,69 ± 0,016	36,30 ± 0,043	44,41 ± 0,039
Pentacarinat®	18,0 ± 0,05	0 ± 0,010	0 ± 0,07

Quando testado com o MTT, o complexo Ag₁, em todas as concentrações, como pode ser visto no gráfico (Figura 18), apresentou resultados baixos no período de 24h. Porém, a concentração de 160 µM/mL manteve – se estável, sem apresentar elevado número de parasitas nos outros dois períodos de tempo estudados, 48h e 72h. As demais concentrações apresentaram aumento no número de parasitas após o período das 24h.

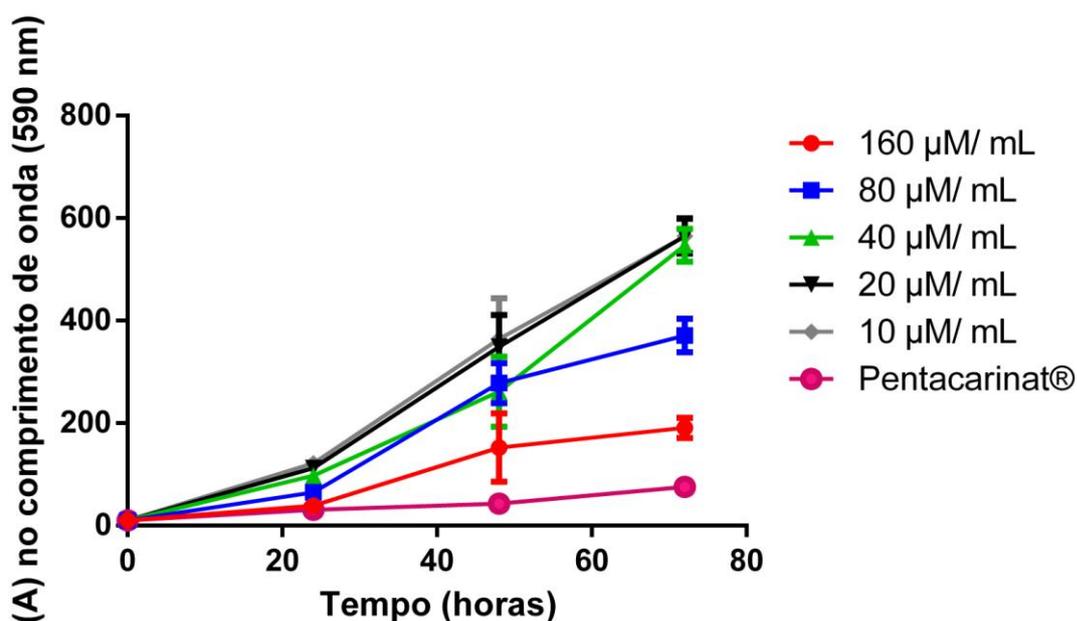


Figura 18: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag₁, Ag(PTA)₄(BF)₄, em cinco concentrações.

Quando testado com o MTT, o complexo Ag₂ apresentou, como pode ser visto no gráfico (Figura 19) similaridade nas primeiras 24h em todas as cinco concentrações. A partir do período de 48h, a concentração de 80µM/ mL mostrou melhor atividade, mantendo essa

atividade até o período de 72h. A concentração de 160 μ M/ mL apresentou aumento no número de parasitas viáveis entre nos período de 24h a 48h, tendo uma queda no período de 72h. As demais concentrações, após o período de 24h, tiveram um aumento no número de parasitas.

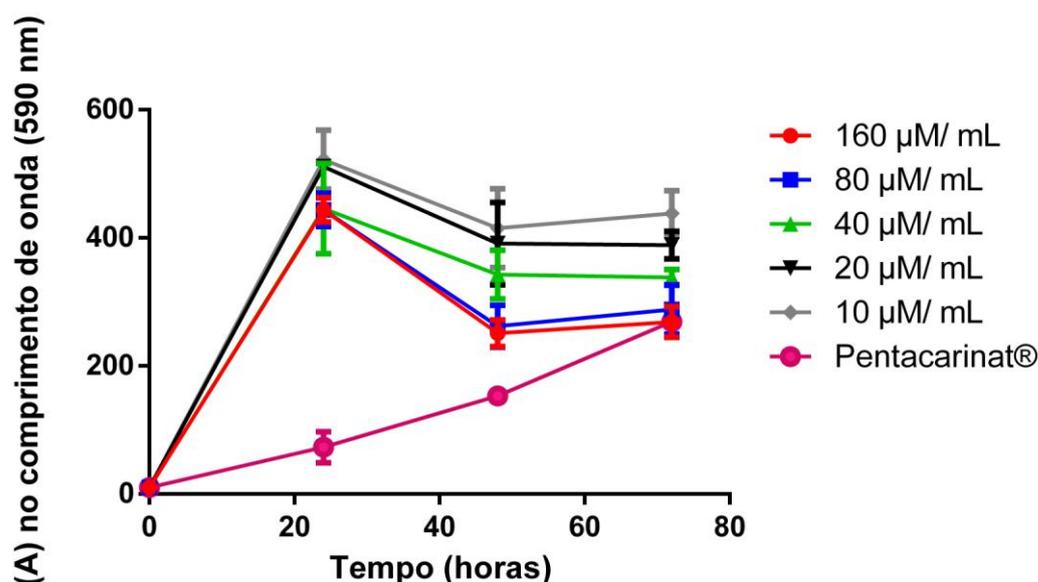


Figura 19: Atividade anti – leishmania do complexo de prata Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$, em cinco concentrações.

8.9. Ensaio de citotoxicidade dos complexos de prata sobre macrófagos de linhagem murino (MTT)

O método do MTT é um ensaio quantitativo para determinar a viabilidade de células. Esse ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo a formação de cristais de formazan, produto formado pela redução de tetrazolio (MOSMANN,1983; LOBNER,2000). A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial (LOBNER,2000).

No ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT, o complexo Ag₁, foi testado utilizando a maior concentração, 160µL/ mL. Quando testado, o complexo Ag₁ apresentou o valor médio de 85,95% células viáveis, depois de 24h em contato com o complexo. O complexo metálico Ag₂, quando testado, apresentou o valor médio de 75% de células viáveis após 24h de exposição ao complexo (Tabela 7).

Tabela 5: Avaliação da citotoxicidade dos complexos metálicos Ag₁e Ag₂ em macrófagos J774, após exposição de 24h

Substância	Células viáveis (%)
Ag₁ (160 µM/mL)	85.95%
Ag₂ (160 µM/mL)	75%

8.10. Determinação da atividade anti-leishmania dos complexos solúveis de prata em amastigotas interiorizados em macrófagos

Para determinar o potencial anti – Leishmania em formas amastigotas dos complexos Ag₁ e Ag₂ foram utilizados macrófagos de linhagem J774. Foi usada a maior concentração testada nos bioensaios com as formas promastigotas, 160µM/ mL dos dois complexos metálicos, para cada uma das espécies, *L.(V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, com triplicatas de cada substância testada. Foi inserida uma lamínula redonda de vidro dentro de cada poço, que foi submetida à impregnação dos complexos metálicos, infecção com parasitas e coradas pelo método panótico. Foram então fixadas em lâminas e analisadas em microscópio óptico, aumento de 400X.

Tabela 6: Avaliação da infecção de macrófagos expostos aos complexos metálicos, Ag₁ e Ag₂, na concentração de 160 µM/mL frente as formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Parasito	Concentração dos complexos/ Taxas de infecção e não infecção de macrófagos					
	Ag ₁ 160µM/mL		Ag ₂ 160µM/mL		Controle	
	I	NI	I	NI	I	NI
	-	-	38%	47%	80%	20%

I: Macrófagos infectados com formas amastigotas *L. (V.) guyanensis*

NI: macrófagos não infectados com formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis*

O complexo Ag₁, na concentração de 160µM/ mL quando testado contra as formas amastigota de *L.(V.) guyanensis*, apresentou lise celular em mais de 50% dos macrófagos, não apresentando interiorização por amastigotas em nenhum dos macrófagos observados (Figura 20A). O complexo Ag₂, na concentração de 160 µM/mL, apresentou macrófagos com as formas amastigotas de *L.(V.) guyanensis* interiorizadas como mostra a (Figura 20B), onde pode - se observar a formação de vacúolos parasitóforos. De acordo com a tabela 6, 38% dos macrófagos foram infectados, ficando 47% sem interiorização de formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis*. O controle (Figura 20C) consistia somente por meio e parasita apresentou maior quantidade de macrófagos infectados, confirmando o potencial de infecção da espécie estudada.

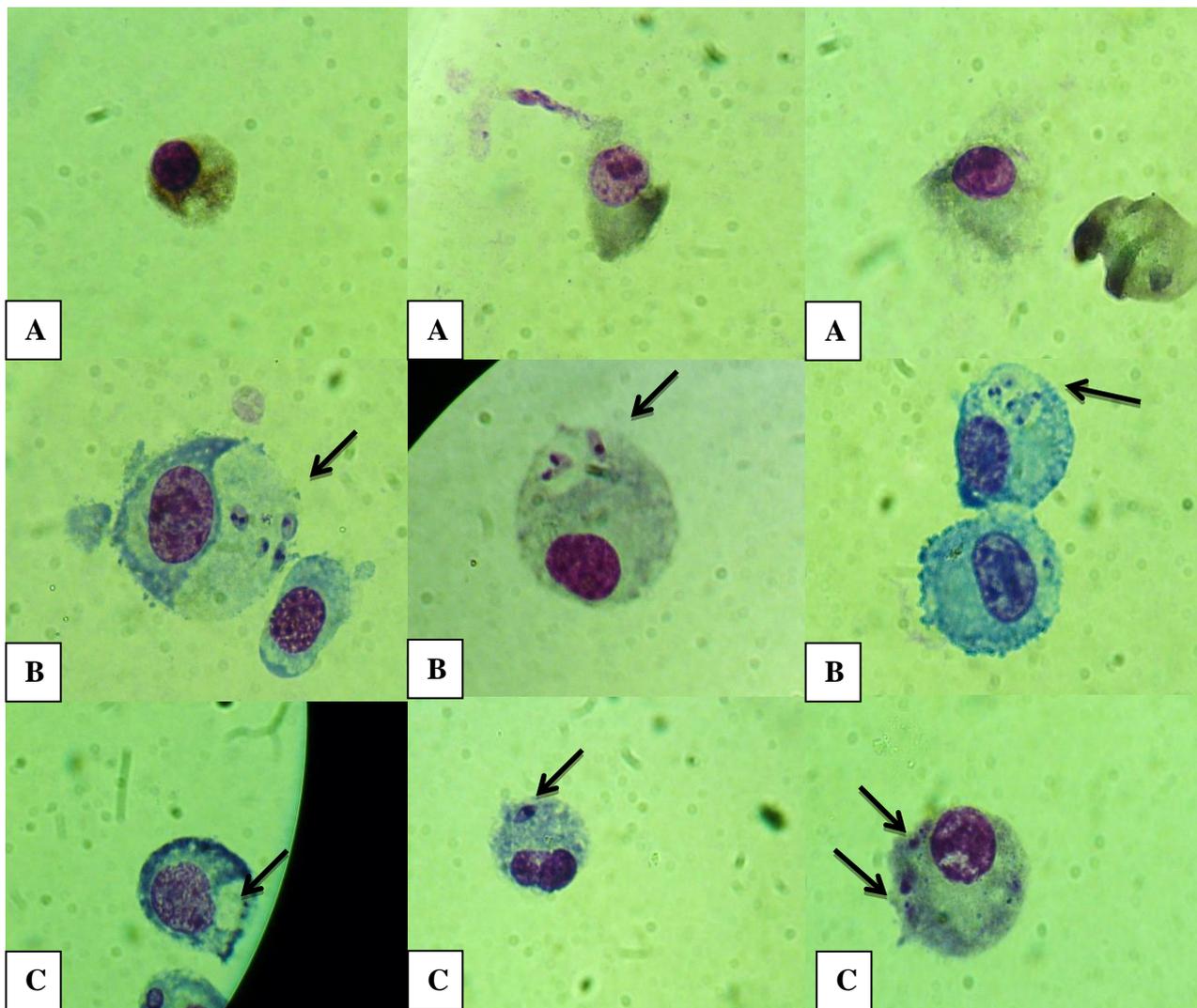


Figura 20: Bioensaios com macrófagos. 20A) Morte de macrófagos, quando testados com o complexo Ag₁, na concentração de 160µM/mL; 20B) formas amastigotas (indicado na seta) de *L. (V.) guyanensis* interiorizadas em macrófagos quando testadas com Ag₂; 20C) macrófagos com as formas amastigotas (indicado na seta) de *L. (V.) guyanensis* interiorizadas, consistindo no grupo controle do bioensaio.

Quando testados contra as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o complexo Ag₁ não apresentou lise celular dos macrófagos, como ocorreu quando testados com as formas amastigotas de *L. (V.) guyanensis*, apresentando maior quantidade de macrófagos não infectados, acima de 50% (Figura 21A). O mesmo ocorre quando testado com Ag₂, na mesma concentração, onde o número de macrófagos não infectados é superior à quantidade de macrófagos infectados, 49,3% (Figura 21B). O controle apresentou macrófagos interiorizados, confirmado o potencial do parasita (Figura 21C).

Tabela 7: Avaliação da infecção de macrófagos expostos aos complexos metálicos, Ag₁ e Ag₂, na concentração de 160 µM/mL frente às formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Parasito	Concentração dos complexos/ Taxas de infecção e não infecção de macrófagos					
	Ag ₁ 160µM/mL		Ag ₂ 160µM/mL		Controle	
	I	IN	I	IN	I	IN
	25%	61%	41%	53%	65%	20%

I: Macrófagos infectados com formas amastigotas *L. (L.) amazonensis*

NI: macrófagos não infectados com formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

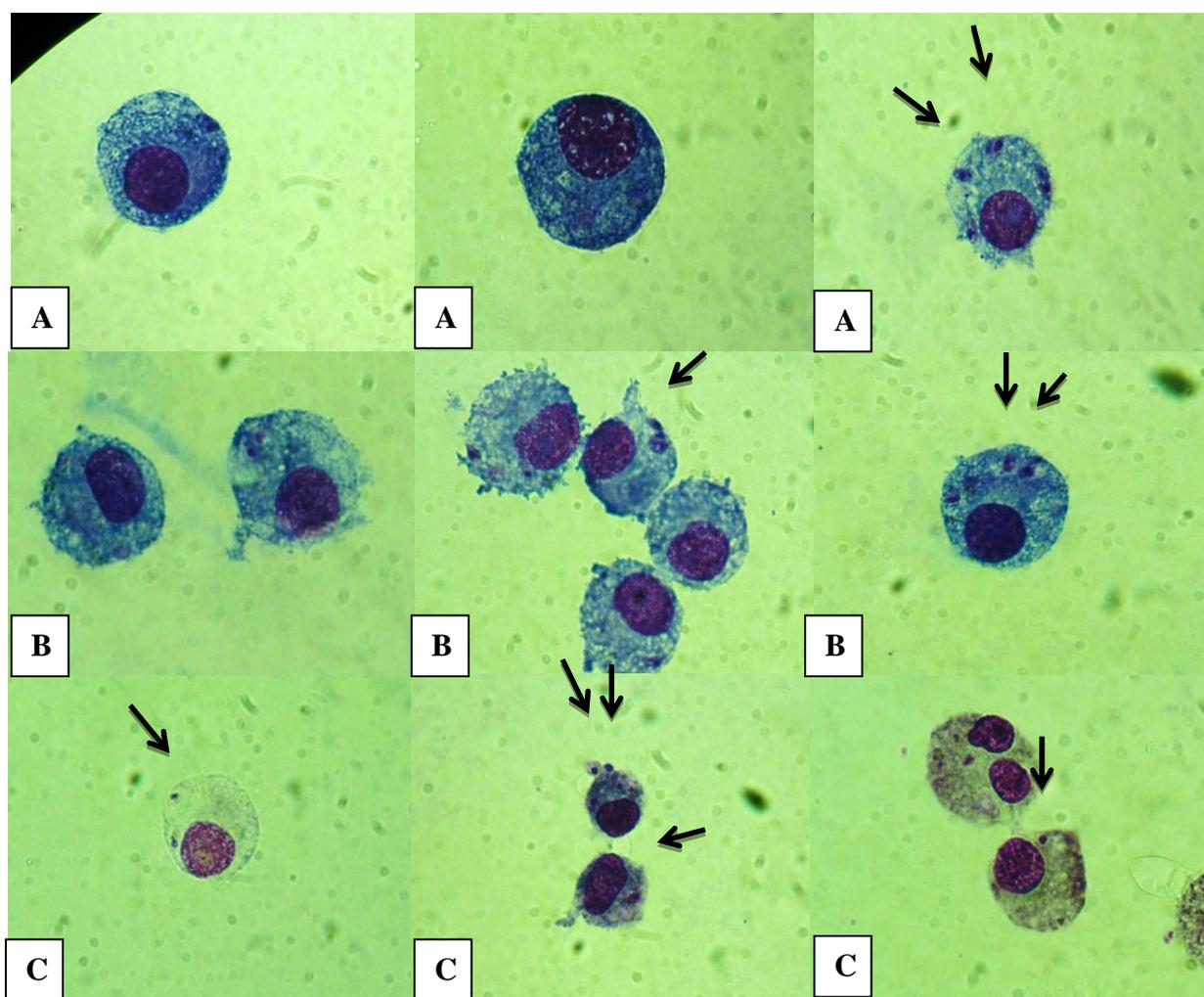


Figura 21: Bionensaios com macrófagos. 21A) Formas amastigotas (indicado na seta) de *L.(L.) amazonensis* interiorizadas em macrófagos, quando testada contra complexo Ag₁, na concentração de 160µM/mL; 21B) formas amastigotas (indicado naseta) de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas em macrófagos quando testadas com Ag₂; 21C) macrófagos com as formas amastigotas (indicado naseta) de *L. (L.) amazonensis* interiorizadas, consistindo no grupo controle do bioensaio.

9.0. Discussão

A Leishmaniose Tegumentar Americana está entre as dez doenças que mais acometem indivíduos no mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. O tratamento com antimoniais pentavalente é utilizado pelo sua eficácia, porém, com restrições. Devido a essa impossibilidade de uso por determinados pacientes, como grávidas, pessoas com cardiopatias, nefropatias, temos a Química Inorgânica Medicinal, que busca utilizar conhecimentos antigos com uso de metais, em especial a prata, como alternativa de tratamento de diversas doenças, entre elas a leishmaniose. Nesse trabalho, foi testado o potencial de dois complexos metálicos, contra duas espécies de leishmania, causadoras da leishmaniose tegumentar.

O fato de um composto metálico, sulfadiazina de prata, ser usado há alguns anos como agente antimicrobiano e antifúngico (GUO, 1999), e impor diversos efeitos nesses organismos, como reagir no grupo tiol nas proteínas, interagir com o DNA e interferir no transporte de elétrons (RUSSEL; HUGO, 1994) motivou o interesse em estudar a atuação de complexos metálicos e seu potencial anti-leishmania dos complexos Ag_1 , $Ag(PTA)_4BF_4$ e Ag_2 , $Ag(PPh)_3(HBPz)_3$ contra parasitas do gênero da *Leishmania*.

O complexo Ag_1 , $Ag(PTA)_4BF_4$, teve seu potencial avaliado pela equipe da Dra. Marina Porchia e Dr, Francesco Tisato, contra células tumorais, apresentando capacidade de reduzir a atividade de TrxR, uma isoenzima chamadatioredoxina redutase por 50%, e este efeito pode ser responsável pela sua notável citotoxicidade para as células tumorais (SANTINI *et al.*, 2011). O complexo metálico Ag_1 , com o ligante PTA, determinou, segundo dado de Santini (2011) uma alteração do estado redox da célula conduzindo a um aumento da produção de peróxido de hidrogênio e a oxidação dos componentes do sistema de TrxR, criando assim as condições para a execução morte da células tumorais. O complexo Ag_2 ainda não havia sido

testado em nenhum sistema biológico, sendo os bioensaios com as formas promastigota de amastigota de *Leishmania* spp. os primeiros.

A ação do complexo Ag₁ frente às formas promastigotas de *L. (V.) guyanensis* não apresentou resultados significativos, nos dois métodos de avaliação, a contagem manual e pelo método do MTT. Os resultados demonstraram elevados números de parasitas viáveis. O complexo Ag₂ apresentou ação moderadamente ativa nos períodos de 24h e 48h, quando avaliado pelo método da contagem manual, e não apresentou atividade no período de 72h. Já utilizando o método do MTT, em todos os períodos estudados, o complexo não apresentou atividade, porém, o número de parasitas viáveis foi diminuindo do período de 24h para o período de 72h.

Quando utilizados contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os dois complexos metálicos apresentaram resultados bastante promissores, nos dois métodos de avaliação, concordando com resultados de Segura (2014), onde foram testados complexos metálicos a base de prata, contra *L. (L.) amazonensis*, porém não com os mesmos ligantes utilizados neste trabalho, onde, a atividade leishmanicida de dois compostos foram comparáveis com a droga de referência, Amphotericina B, com valores de EC₅₀ 0,06 µM/mL e 0,08 µM/mL, em relação a droga de referência, 0,57 µM/mL, utilizando o método de contagem manual.

Outros estudos foram realizados, utilizando complexos metálicos contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania* sp. Um dos complexos mais importantes utilizados contra a *Leishmania* é o de cisplatina, apresentando ação em formas promastigota e amastigota, inibindo o crescimento de amastigotas de *L. (L.) donovani*, causando 100% a 99% de inibição do crescimento, na concentração de 1 µM. Estudos com complexos de Cu, Au e Ag, apresentaram atividade antiproliferativa de *L. (L.) mexicana*. E complexos de Cu tem apresentado atividade leishmanicida contra *L. (V.) braziliensis* (TAHGHIGHI, 2014).

Os resultados dos ensaios citotóxicos mostraram toxicidade por parte do complexo Ag₁, quando testado na concentração de 160 µM/mL frente às formas amastigota de *L. (V.) guyanensis*, provocando a morte dos macrófagos. Quando testados frente às formas amastigota de *L. (L.) amazonensis*, ambos complexos não apresentaram toxicidade. Existem relatos na literatura de que a prata apresenta baixa toxicidade nos humano, sendo o risco de contaminação o mínimo possível (BRANDT *et al.*, 2005). Devido ao crescente uso de compostos a base de prata, e por ela apresentar essa toxicidade, existem estudos preocupados com tal toxicidade, embora ela seja demonstrada apenas *in vitro*, que pode ser vista nos macrófagos quando testados com o complexo metálico Ag₁ (GREULICH *et al.*, 2012; MIJNENDONCKX *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que existem poucos estudos na literatura usando compostos a base de prata como agente leishmanicida, sendo, em sua maioria, utilizando nanopartículas. Porém, os estudos tendem a ser promissores.

10.0. Conclusões

Neste trabalho, foram estudadas a atividade de dois complexos metálicos, Ag₁ e Ag₂, a base de prata. Pouco se sabe da ação desses complexos, principalmente o complexo Ag₂, que, até a realização deste estudo, ainda não havia sido testado em sistemas biológicos.

O complexo Ag₁ possui ação confirmada no tratamento de células tumorais, porém também não havia sido utilizado para ensaios com parasitas, em especial os do gênero da *Leishmania*. Sendo assim:

- Foi possível demonstrar ações diferentes dos complexos metálicos a base de prata Ag₁, Ag(PTA)₄BF₄, e Ag₂, Ag(PPh)₃(HBPz)₃, contra as espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*, demonstrando a necessidade de tratamento diferenciado e específico para a leishmaniose cutânea;

- Os bioensaios com o complexo Ag₁ não apresentou atividade anti-leishmania satisfatória para a espécie *L. (V.) guyanensis*, seja com as formas extra – celulares (promastigotas) ou intra-celulares (amastigotas), o complexo Ag₂ mostrou – se moderadamente ativo nos períodos de 24h e 48, somente quando testado pelo método de contagem manual;

- Os testes contra *L. (L.) amazonensis*, quando testadas em formas extra- celulares (promastigotas), demonstraram – se satisfatórios, visto que, para essa espécie, resultados obtidos com o uso do complexo Ag₂ foram semelhantes com aos resultados obtidos com Pentamidina®, droga de uso para o tratamento da leishmaniose;

- Os testes contra *L. (L.) amazonensis* na forma intra-celular, também apresentaram bons resultados, com poucas amastigotas interiorizadas dentro dos macrófagos de linhagem J774 ;

- Os testes de citotoxicidade mostraram que, ambos complexos, não apresentaram toxicidade quando testados em macrófagos de linhagem J774 quando submetidos a infecção pro *L. (L.) amazonensis* sendo possível a realização de testes *in vivo*, sem que haja complicações por conta da toxicidade com essa espécies. Quando testado a toxicidade contra

L. (V.) guyanensis, somente o complexo Ag₁ causou morte dos macrófagos, demonstrando ser tóxico, necessitando de mais estudos para que sejam realizados testes *in vivo* com a espécie e o complexo metálico.

- Com base nos resultados mais eficazes para um dos complexos metálicos, a realização de novos ensaios *in vivo*, com animais de experimentação, poderia oferecer melhores informações quanto à atividade do complexo Ag₂ fornecendo melhores perspectivas de uso deste complexo e sua real ação contra esta enfermidade.

11.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anuais Brasileiro de Dermatologia*. 86 (3): 497-506. 2011.

ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR E. S.; BAGIROVA, M.; USTUNDAG, C. B.; KAYA, C.; KAYA, F.; RAFAILOVICH M. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2705-14. doi: 10.2147/IJN.S23883. Epub 2011.

ALTAF, M.; STOECKLI-EVANS, H.; CUIN, A.; SATO, D. N.; PAVAN, F.R.; LEITA, C. Q.F.; AHMAD, S.; BOUAKKA, M.; MIMOUNI, M.; KHARDLI, F.Z.; HADDA, T. Synthesis, crystal structures, antimicrobial, antifungal and antituberculosis activities of mixed ligand silver (I) complexes. *Polyhedron*, v. 62, p. 138 – 147, 2013.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M; WHO Leishmaniasis: Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671. Epub May 31, 2012.

ATKINS, P. *Inorganic chemistry*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2010.

ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios da química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. 3 ed. São Paulo: Bookman, 2005.

BAIOCCOP.; ILARI, A.; CECI, P.; ORSINI, S.; GRAMICCIA, M.; MUCCIO, T. D.; COLOTTI, G. Inhibitory effect os silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. *Medicinal Chemistry Letters*, v. 2, p. 230 – 233, 2011.

BAKTHIAR, R.; OCHIAI, E. Gen. Pharm, 32, 525. 1999

BARREIRO, E.; CASAS, J.S.; COUCE, M. D.; SÁNCHEZ, A.; SORDO, J.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, E. M. Heteronuclear gold (i)-silver(i) sulfanylcarboxylates: synthesis, structure and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 131, p. 68-75, 2014.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira Epidemiologia*. v. 7, n.3, 2004.

BERN, C.; MGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.2, n.10, p.E313, 2008.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, n. 1, p. 51-56, 2005.

BRANDT, D.; PARK, B.; HOANG, M.; JACOB, H. T.; Argiria secondary to ingestion of homemade silver solution. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, p. S105 – S107, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Revista de Saúde Pública*, v.44, n.1, p.200-220, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 179p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_Ita_2ed.pdf. Acesso em 18/06/2014.

CARVALHO, R. F. Estudo in vivo da ação de nanocápsula de PLGA contendo anfotericina B, DMSA e nanopartículas magnéticas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em

camundongos C57BL/6 causados pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2011.

CHANG, K.P.; REED, S. G.; SOONG, L. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasites multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 85;(3): 375-90.; 2003.
characterization of unusual metal-piperazine chelates. *Inorganic Chimica Acta*, v.369, p.

CHEN, D.; MILACIC, V.; FREZZA, M.; DOU, Q. P. *Curr.Pharm. Dees.* 15, 777. 2009

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 75, n.1, p. 3 – 17, 2005.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin.Microbiol. Rev.* , v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania* . *Exp. Mol. Pathol.* , v. 72, p. 132-141, 2002.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.M.; ALVES, F.A.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis* : long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol.*, v. 89, n.1, p. 58-62, 1998.

FREITAS-JUNIOR, Lucio H.; CHATELAIN, Eric; KIM, Helena Andrade; SIQUEIRANETO, Jair L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2, p.11–19. 2012.

GILMAN,A.G.; GOODMAN, L.S.As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 11ª ed.editora Guanabara, Rio de Janeiro, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71 – 80, 2003.

GOTO, H. et al. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*.v, 8, n. 4, p. 419 – 433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, Jal. *Expert Review Of Anti – Infective Therapy*.8 (4): 419-433. 2010.
GREULICH, C.; BRAUM, D.; PEETSCH, A.; DIENDOR, J.;SIEBERS, B.; EPPLE, M.; KOLLER, M. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cell occur in the same concentration range. *RSC Advances*, v. 2, p. 6981-6987, 2012.

GUERRA, J. A. O. et. al. Leishmaniose tegumentar em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n.9, p. 2215-2223, set, 2007.

GUO, Z.; SADLER, P. J. *Metals in medicine*. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, p. 1512-1531, 1999.

HARTINGER, C. G.; NAZAROV, A. A.; ASHRAF, S. M.; DYSON, P. J.; KEPLER, B. K. *Curr. Med. Chem.* 15, 2574 2008.

JOB, A. E.; SIQUEIRA, A. F.; DANNA, C. S.; BELLUCCI, F. S.; CABRERA, F. C.; SILVA, L. E.; AOKI, P. H. B. *Nanoparticle Technology: Na alternative approach for Leishmaniasis Treatment*. Department of Physycs, Chemistry and Biology, Uni. Estadual Paulista, São Paulo, Brazil, 2014

KELLAND L. *Nature*. 7, 573 2007.

KILLICK-KENDRICK R, RIOUX J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in the sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Compareé* 66 (suppl. 1): 71-74, 1991.

LAINSON, R. *Leishmania e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil*. *Revista Paraense de Medicina*; 11 (1): 29-40. 1997

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, v.273, p. 595-600. 1978

LANDSDOWN, A. B.G. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problems in Dermatology*, v. 33, p. 17-34, 2006.

LEE, H. Fabrication of silver nanoparticles via self-regulated reduction by 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium tetrafluoro-borate. *Kor. J. Chem. Eng.* 24:856-859. 2007.

LOUREIRO, C. C. P.; DADALIT, P.; GUTIERREZ, M. C. G.; SILVA, M. R. Leishmaniose: Métodos e Diagnósticos. *Folha Médica*, 117:2, 131-134. 1998.

MIJNENDONCKX, K.; LEYS, N.; MAHILLON, J.; SILVER, S.; HOUDT, R. V. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, v. 26, p. 609-621, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília; 2000.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, v. 65, Issues 1-2, pg, 55-63, 1983.

MOYER, C. A.; BRETANO, L.; GRAVENS, D. L.; MARGRAF, H. W.; MORFANO, W. W. *Arch. Surg.* 90, 812. 1965.

NEVES, B. J. N. Concentração de antimônio em plasma e pele de pacientes com leishmaniose cutânea – relação com efeitos colaterais após o tratamento com antimoniato de N-Metil-Glucamina. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2008.

OLIVEIRA – NETTO, M. P.; SCHUBACH, A.; ARAÚJO, M. L.; PIRNEZ, C. High and low doses of antimony (SB^v) in american cutaneous leishmaniasis. A five years follow – up study of 15 pacientes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, 207-209, 1996.

OLIVEIRA, M. C.; AMORIM, R. F. B.; FREITAS, R. A.; COSTA, A. L. L. Óbito em caso de Leishmaniose cutâneo-mucosa após o uso de antimonial pentavalente. *Rev Soc Med Trop*, 38, 258-260, 2005.

OTT, I.; *Coord. Chem. Rev.* 253, 1670 - 2009.

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R. A. DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/ hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 1898-1905, 2010.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, 2010.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection*, v. 60, p. 1-7, 2005.

PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L. R.; CODONHO, B. S.; BARBIÉRI, C. L. BEIJO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; D'MARTIN, E. C.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extractas from *Garcinia brasiliensis* Mart. *Fruits. Phytomedicine*, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

RAHI, A. A.; ALI, M. A.; AL-CHARRAKH, A. H. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Leishmania tropica*. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 12(48), pp. 6718-6722, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-596. 2007.

resistência bacteriana. *Química Nova*, v.34, n.1, p. 111-118, 2011.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à

ROMERO, G. A. S.; FLORES, E. M. M.; NORONHA, E. F.; MACÊDO, V. O. High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with meglumine

antimoniats contaminated with heavy metals. A comparative approach using historical controls. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 145-149, 2003.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry*, v. 31, p. 351-370, 2004.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry*, v. 31, p. 351-370, 1994.

SAMPAIO S. A. P.; RIVITTI, E.A. *Dermatologia*. 3. Ed. São Paulo: Artes Médicas; p. 755-64. 2008.

SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, T. M. P.; ARAUJO, M. L.; VALE, A. C. F.; PASSOS, S. R. L.; MARZODI, M. C. A. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38, 213 – 217, 2005.

SEGURA, D. F.. Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos de prata (I) contendo ligantes baseados na 1, 10-fenantrolina e tiouréia. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. 2014.

SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in amazonian brazil - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 2, p. 239 – 251, 2004.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L.* (L.) *amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 31, p. 423 – 431, 2009.

SINGH S.; SIVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal Infect Chemotherapy*. v. 10, p. 307-315. 2004. Doi 10.1007/s10156-004-0348-9.

SINGH, R. K. SRIVASTAVA, A., SINGH, N. Toll-like receptor signaling: A perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiological Research*.v.167, p. 445-451, 2012.

WHO informal consultative meeting for the control of cutaneous leishmaniasis in the middle east and maghreb, 2007. Geneva. Cutaneous leishmaniasis: why you neglecting me? Geneva: World Health Organization, 2007.

ZHANG, C. X.; S.J. Lippard, S. J. *Curr.Opin.Chem. Biol.* 7, 481. 2003.