



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE -
COSAS**

ANA FLÁVIA DA SILVA CHAGAS

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM COMPLEXOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

MANAUS/AM

2021

ANA FLÁVIA DA SILVA CHAGAS

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO COM COMPLEXOS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, Doutora.

Coorientador: Andriy Grafov, Doutor.

MANAUS/AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C433e Chagas, Ana Flávia da Silva
Estudo pré-clínico com complexos e nanopartículas metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea. / Ana Flávia da Silva Chagas . 2021
181 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientador: Andriy Grafov
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose. 2. Complexos de coordenação. 3. Nanotecnologia. 4. Metais. I. Franco, Antonia Maria Ramos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Estudo pré-clínico com complexos e nanopartículas metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea”

DISCENTE: ANA FLÁVIA DA SILVA CHAGAS

PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós- Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 27/09/2021.


Prof. Dr. Emerson Silva Lima Coordenador do
PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Antonia Maria Ramos Franco Pereira, DSc.
Pesquisador titular III, Produtividade CNPq 2
CSAS/Lab. Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA
Av. André Araújo, no. 2936, Aleixo
Tel +55 (92) 3643-3068/3065, Fax +55 (92) 3643-3061
e-mail: afranco@inpa.gov.br

Antonia Maria Ramos Franco Pereira
Pesquisador Titular
SIAPE nº 1313036
INPA/MCT

Profa. Dra. Antonia Maria Ramos Franco
Orientadora e presidente da banca

Fulgência Bandeira

Profa. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira Membro
(UFAM)

Iryna

Profa. Dra. Iryna Grafova
Membro (Universidade de Helsinki)

Aline Fagundes da Silva

Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva Membro
(Fiocruz)

Dominique Fernandes de Moura do Carmo

Profa. Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo
Membro (UFAM)

AGRADECIMENTOS

– Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

– E isso importa?

– Mais do que a própria guerra!

(Ernest Hemingway)

A Deus pelos milagres, pela perfeição da natureza e por me permitir ver na ciência e na pesquisa as suas maravilhas. Por todo cuidado diário me permitindo conhecer pessoas incríveis, corajosas, honestas e leais, que me inspiraram, me fortaleceram e me incentivaram. Por ter me dado oportunidades e desafios incríveis, além da coragem para aceitar, viver e não desistir nos momentos mais difíceis.

A mim mesma por toda a resiliência e persistência, por todo carinho que dediquei a essa pesquisa e pela paciência que dispensei a mim mesma para aceitar as mudanças e crescimento; e especialmente por ter aprendido a respeitar o meu tempo para aprender, ensinar, crescer e mudar durante essa jornada.

A Dory minha eterna amiga e companheira que me recebe em casa com ânimo sem igual mesmo após muitas horas ou meses ausente; sem dúvida minha metade de quatro patas.

Aos meus pais e ao meu irmão por toda a educação, amor, carinho e paciência dados a mim durante toda essa jornada acadêmica e em todos os dias da minha vida.

A Dra. Antonia Franco pela confiança dispensada a mim em muitos momentos e pelas oportunidades, ensino, incentivo, paciência e cobranças.

A Dra. Maricleide Naiff por toda a paciência, carinho e conselhos, muito do meu caráter pessoal e profissional foram forjados e modificados em nossas infinitas horas de conversa.

A Dra. Marina Porchia e Dr. Francesco Tisato por toda paciência em compartilhar conhecimentos da química, pela colaboração, compromisso, confiança e pontualidade.

Ao Dr. Andriy Grafov pela receptividade na Finlândia, paciência em compartilhar conhecimentos da química e pela colaboração, compromisso, confiança e pontualidade.

Ao técnico Lourival Maciel por toda ajuda e ensinamentos compartilhados.

A MSc. Anny Maíza Brasil pela parceria, colaboração, carinho, amizade, paciência e respeito, sua colaboração foi imprescindível na realização dessa pesquisa. Dividir a bancada,

os desafios, as alegrias e tristeza com você foi uma honra e desejo imensamente que possamos compartilhar mais viagens, mais alegrias e momentos de diversão.

A MSc. Pauline Soldera pela parceria desde o mestrado, por toda paciência, bondade, carinho e respeito.

Aos ex alunos de PIBIC que colaboraram com esse projeto, Thais Pinto, Breno Mota, Theodora Paiva, Carolina Correa, Kamila Vieira, Joyara Menezes e Rayane Matsuhi, muito obrigada por toda a colaboração e pelos ensinamentos. Especialmente ao Breno Mota, Theodora Paiva e Carolina Correa que me ensinaram muito sobre pesquisa, ensino e extensão, e por serem sempre presentes em momento cruciais e sobretudo por terem se tornado grandes amigos, tenho muito orgulho de vocês.

Aos meus amigos Ellen Diana Lopes e José Roberto Lopes por toda a parceria, companheirismo, conversas e churrasco nos últimos anos.

A todos que direta ou indiretamente estiveram presentes e colaboraram com essa pesquisa e com minha formação.

Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Programa Europeu Horizon 2020MSCA-RISE-2016 –VAHVISTUS.

EPÍGRAFE

Todo o Universo se formou no seu falar [...]
Dono de toda a ciência, sabedoria e poder [...]
Antes que o haja houvesse Ele já era Deus.

(Preto no Branco – Ninguém explica Deus)

‘They said I would never make it
But I was built to break the mold
The only dream that I've been chasing is my own.’

(Alicia Keys – Underdog)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença infecciosa, que apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo esta causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente, o antimoniato de meglumina é o tratamento de primeira escolha no Brasil e o isetionato de pentamidina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal são os medicamentos de segunda escolha. Devido à eficácia limitada e alta toxicidade desses fármacos há a necessidade de estudos para o desenvolvimento de medicamentos que possuam maior eficácia e menor toxicidade. Neste sentido, a química inorgânica medicinal vem despertando o interesse da comunidade científica, dado os seus estudos com íons metálicos que tem apresentado atividades terapêuticas promissoras. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade antileishmania de complexos e nanopartículas metálicas. Deste modo, foram realizadas avaliações *in vitro* da atividade antileishmania em formas promastigotas e amastigotas, bem como a avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos. As substâncias que se apresentaram promissoras nos ensaios *in vitro* foram selecionadas para os ensaios *in vivo*, tendo sido avaliada a atividade antileishmania do complexo de cobre(I) e das nanopartículas de tântalo (NPsTa) em hamsters e camundongos infectados com *Leishmania* spp., respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* o complexo cobre(I) e os complexos de paládio(II) apresentaram citotoxicidade moderada com viabilidade celular média de 80% e 60%, respectivamente; enquanto que as nanopartículas de tântalo (NPsTa) e nanopartículas de bismuto (NPsBi) não apresentaram citotoxicidade, com viabilidade celular de 94% e 90%, respectivamente. O complexo de cobre(I) apresentou melhor eficácia em promastigotas (CI₅₀ 0,071 mM) e amastigotas [redução de 75% da taxa de infecção (TI)] de *L. (V.) braziliensis*. Os complexos de paládio(II) foram eficazes em inibir promastigotas (CI₅₀ < 0,00037 mM) e em formas amastigotas apresentaram redução de 20% da TI de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. As NPsTa induziram a inibição parasitária das formas promastigota (CI₅₀ 3 µM) e amastigotas (redução 50% da TI) de *L. (V.) braziliensis*. As NPsBi apresentaram melhor eficácia na inibição de promastigotas (CI₅₀ 0,05 µM) e amastigotas (redução de 70% da taxa de infecção) de *L. (L.) amazonensis*. Os ensaios *in vivo* foram realizados com o complexo de cobre(I) e NPsTa e os dados gerais dos ensaios biológicos *in vivo* demonstraram que o tratamento tópico com pomada contendo o complexo de cobre(I) mostraram baixa eficácia na redução no volume do focinho de hamsters (redução < 18%) e o tratamento intralesional com as NPsTa induziram um aumento significativo (aumento de 28%) no volume da pata dos camundongos, com uma ação inflamatória exacerbada no local da aplicação das NPsTa. Diante dos resultados obtidos, ficou evidente que as substâncias inorgânicas testadas apresentaram atividade promissora *in vitro*, especialmente em formas promastigotas e com citotoxicidade moderada ou mínima para macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos. Nos ensaios *in vivo* o complexo de cobre(I) e as NPsTa não induziram cura clínica e parasitológica nas concentrações, tempo e formulações testadas.

Palavras – chave: leishmaniose, complexos de coordenação, nanotecnologia, metais.

ABSTRACT

Tegumentary Leishmaniasis is an infectious disease that presents different clinical manifestations, caused by protozoa of the *Leishmania* genus. Currently, meglumine antimoniate is the first-choice treatment in Brazil and pentamidine isethionate, amphotericin B and liposomal amphotericin B make part of the second-choice drugs. Due to the limited efficacy and high toxicity of these drugs, there is a need for studies to develop drugs that have greater efficacy and less toxicity. In this sense, medicinal inorganic chemistry has been arousing the interest of the scientific community, given its studies with metallic ions that have shown promising therapeutic activities. The present study aimed to evaluate antileishmanial *in vitro* and *in vivo* activity of metal complexes and nanoparticles. Thus, *in vitro* evaluations of antileishmanial activity in promastigote and amastigote forms were carried out, as well as the evaluation of cytotoxicity in murine peritoneal macrophages and human monocytes. The substances that showed promise in the *in vitro* assays were selected for the *in vivo* assays, in which the antileishmanial activity of the copper (I) complex and tantalum nanoparticles (TaNPs) was evaluated in hamsters and mice infected with *Leishmania* spp., respectively. The obtained results demonstrated that in the *in vitro* cytotoxicity assays the copper (I) complex and the palladium (II) complexes presented moderate cytotoxicity with mean cell viability of 80% and 60%, respectively; while tantalum nanoparticles (TaNPs) and bismuth nanoparticles (BiNPs) did not show cytotoxicity, with cell viability of 94% and 90%, respectively. The copper (I) complex showed better efficacy in promastigotes (IC₅₀ 0.071 mM) and amastigotes [reduction of 75% of the infection rate (IR)] of *L. (V.) braziliensis*. Palladium (II) complexes were effective in inhibiting promastigotes (IC₅₀ < 0.00037 mM) and in amastigote forms showed a 20% reduction in the IR of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis*. TaNPs induced parasitic inhibition of promastigote (IC₅₀ 3 μM) and amastigotes (50% reduction in IR) of *L. (V.) braziliensis*. BiNPs showed better efficacy in inhibiting promastigotes (IC₅₀ 0.05 μM) and amastigotes (70% reduction in the infection rate) of *L. (L.) amazonensis*. *In vivo* assays were performed with copper (I) complex and TaNPs and general data from *in vivo* biological assays demonstrated that topical treatment with ointment containing copper (I) complex showed low efficacy in reducing the volume of the snout of hamsters (reduction < 18%) and intralesional treatment with TaNPs induced a significant increase (increase of 28%) in mouse paw volume, with an exacerbated inflammatory action at the site of application of TaNPs. According to the obtained results, it was evident that the inorganic substances tested showed promising activity *in vitro*, especially in promastigote forms and with moderate or minimal cytotoxicity to murine peritoneal macrophages and human monocytes. In *in vivo* assays, copper (I) complex and TaNPs did not induce clinical and parasitological cure at the tested time, concentrations, and formulations.

Keywords: leishmaniasis, coordination complexes, nanotechnology, metals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formas amastigotas (A) interiorizadas em macrófago e formas promastigotas (B) de <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 2 – Inseto vetor (Diptera: Psychodidae).....	27
Figura 3 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.....	30
Figura 4 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose cutânea localizada (A); disseminada (B); recidiva cútis (C) e difusa (D).	33
Figura 5 – Polimorfismo das lesões de Leishmaniose cutânea. Lesão tipo pápula (A); lesão em placa (B); úlcera franca (C); impetigóide (D); ectimatoide (E); nodular (F); úlcero-vegetante (G) e lesão verrucosa (H).....	33
Figura 6 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose mucocutânea mucosa tardia (A); mucosa sem lesão cutânea prévia (B); mucosa concomitante (C); mucosa contígua (D) e mucosa primária (E).	35
Figura 7 – Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil (2015 - 2019).	37
Figura 8 – Casos de Leishmaniose Tegumentar nas Regiões Brasileiras (2015 - 2019).	38
Figura 9 – Casos de Leishmaniose Tegumentar na Região Norte (2017).	39
Figura 10 – Estrutura química do antimônio pentavalente (antimoniato de meglumina). BKchem [®]	40
Figura 11 – Estrutura química do desoxicolato de anfotericina B. BKchem [®]	42
Figura 12 – Estrutura química do isetionato de pentamidina. BKchem [®]	43
Figura 13 – Estrutura química da pentoxifilina. BKchem [®]	44
Figura 14. Pomadas envasadas em seringas para administração em animais de experimentação com lesões leishmanióticas.....	71
Figura 15 – Estrutura molecular de complexo [HB(pz) ₃]Cu(PCN) (PCN = tris-cianometilfosfina, HBPz ₃ = ânion trispirazolilborato).	81
Figura 16 – Curva de crescimento das espécies <i>Leishmania</i> . (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i> (linha azul), <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>guyanensis</i> (linha rosa), <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> (linha verde) e <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>naiffi</i> (linha marrom).	86

Figura 17 – Viabilidade parasitária de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A); <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B), <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C) e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> (D). Controle (promastigotas não tratadas), tratadas com DMSO (1%), Glucantime® (33 mM) ou complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04, 0,02 e 0,01 mM). Cada barra representa a média ± desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	88
Figura 18 – Taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A); <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B), <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C) e <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i> (D). Controle (macrófagos peritoneais murinos não tratados), tratados com Glucantime® (33 mM) ou complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 mM). Cada barra representa a média ± desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	90
Figura 19 – Consistência da pomada de complexo de cobre em diferentes temperaturas em T(30).	91
Figura 20 – Pomadas (placebo e complexo de cobre) após a centrifugação.	91
Figura 21 – Volume do focinho de <i>hamsters</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A), <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C). Hamster não infectado e não tratado (linha marrom), infectado e não tratado (linha rosa), infectado e tratado com placebo (linha laranja), infectado e tratado com 20 mg/kg/dia de Glucantime® por via intramuscular (linha verde) e infectado e tratado com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I) (linha azul).	93
Figura 22 – Aspecto clínico das lesões em focinho de <i>Mesocricetus auratus</i> infectado por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) no 25º dia de tratamento, <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C) no 30º dia de tratamento. A1, B1, C1 - animal não infectado e não tratado. A2, B2, C2 - animal infectado e não tratado. A3, B3, C3 - animal infectado e tratado com Glucantime® (20 mg/kg/dia por via intramuscular). A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com placebo. A5, B5, C5 - animal infectado e tratado com 80 mg pomade contend 0,5 mg de complexo de cobre(I).	94
Figura 23 – Taxa de infecção em macrófagos contada pela impressão em lâmina de fragmentos de lesões de <i>hamsters</i> infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A); <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (C). Animais infectados e não tratado (barra rosa), animais infectados e tratados com 20 mg/kg/dia de Glucantime® (barra verde), animais infectados e tratados com placebo (barra laranja) e	

animais infectados e tratados com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I) (barras azuis). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes.....	95
Figura 24 – Viabilidade de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B) expostas ao Glucantime® (33 mM), complexos de Pd(II) (0,06 a 0,0038 mM) e ibandronato de sódio, prodonato de sódio e ácido etidrônico (0,06 mM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	114
Figura 25 – Taxa de infectividade de macrófagos peritoneais murinos infectados por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). Controle negativo (macrófagos não tratados), Glucantime® (33 mM), Pd(2) e Pd(3) (0,06, 0,03, 0,015 e 0,0075 mM), ibandronato de sódio e prodonato de sódio (0,06 mM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	115
Figura 26 - Caracterização de NPsTa quanto a distribuição do tamanho da partícula (A) e potencial ζ (B).....	128
Figura 27 - Viabilidade parasitária de formas promastigotas (A) e taxa de infecção (B) de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Controle (-) sem tratamento, Glucantime® (3 $\mu\text{M}/\text{mL}$); NMGA (30 $\mu\text{M}/\text{mL}$) e NPsTa (3 a 0,19 $\mu\text{M}/\text{mL}$). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).	129
Figura 28 - Peso corporal (A) e evolução clínica do volume das patas (B) de <i>Mus musculus</i> BALB/c. Controle (+) camundongos não infectados; controle (-) infectados e não tratados; placebo; Glucantime® (infectados e tratados com 20 mg/Sb ⁵⁺ /kg/dia) e NPsTa (infectados e tratados com 3 μM).	131
Figura 29 - Aspecto clínico morfológico macroscópico de nódulos dérmicos em <i>Mus musculus</i> BALB/c, infectados por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> durante o tratamento (intervalos de 72h). Controle (+) camundongos não infectados (A); controle (-) infectados e não tratados (B), placebo (C), Glucantime® (infectados e tratados com 20 mg/Sb ⁵⁺ /kg/dia) (D) e NPsTa (infectados e tratados com 3 μM) (E).	132
Figura 30 - Taxa de amastigotas, macrófagos infectados e não infectados de fragmentos do dorso da pata de <i>Mus Musculus</i> infectados com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Controle negativo (barras pretas), tratados com 20 mg/Sb ⁵⁺ /kg/dia de Glucantime® (barras cinzas	

claro), Placebo (barras pontilhadas) e 3 μM de NPsTa (barras cinzas escuro). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras.	133
Figura 31 - Caracterização de NPsTa quanto a distribuição do tamanho da partícula (A) e potencial ζ (B).....	144
Figura 32 – Viabilidade parasitária de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (B). Controle (-) promastigotas sem tratamento, Glucantime [®] (0,87 μM), MES (4,35 μM) e NPsBi (0,87 a 0,05 μM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).	146
Figura 33 – Taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (A) e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> . Controle (-) macrófagos infectados sem tratamento, Glucantime [®] (0,87 μM), MES (4,35 μM) e NPsBi (0,87 a 0,05 μM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.	148
Figura 34 - Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos tratados com Glucantime [®] (0,87 μM), MES (4,35 μM) e NPsBi (0,87 a 0,05 μM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do gênero <i>Leishmania</i>	25
Tabela 2 – Relação entre manifestações clínicas e espécies de <i>Leishmania</i> no Novo Mundo. ...	36
Tabela 3 – Protocolo Terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde.	45
Tabela 4 – Preços de medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose.*	47
Tabela 5 – Esquema de ensaios biológicos realizados com as diferentes substâncias.	67
Tabela 6 – Composição da pomada.	71
Tabela 7 – Concentração Inibitória (CI_{50} mM \pm SD) e índice de seletividade (IS) de [HB(pz) ₃]Cu(PCN) e Glucantime [®] em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	87
Tabela 8 – Concentração Inibitória máxima (CI_{50} mM \pm SD) do complexo [HB(pz) ₃]Cu(PCN) e Glucantime [®] em amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos.	89
Tabela 9 – Viabilidade celular média (%) de macrófagos peritoneais murinos na presença de complexos de Pd(II), ibandronato, iedrônico, prodonato e Glucantime [®]	112
Tabela 10 – Metade da concentração inibitória máxima (CI_{50} mM \pm SD) dos complexos de paládio, Glucantime [®] , ibandronato de sódio, prodonato de sódio e ácido etidrônico em promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	113
Tabela 11 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das NPsTa em formas promastigotas e amastigotas.	128
Tabela 12 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das NPsBi, Glucantime [®] e MES em formas promastigotas.	144
Tabela 13 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das NPsBi, Glucantime [®] e MES em formas amastigotas.	147

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
µg	Micrograma
µM	Micromol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEN	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
ANOVA	Análise de variância
ARN	Ácido ribonucleico
Bi	Bismuto
BR	Brasil
Ca	Cálcio
CAAE	Certificado de apresentação de apreciação ética
CC	Concentração citotóxica 50%
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de carbono
CoCl ₃	Cloreto de cobalto
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsufóxido
ECG	Eletrocardiograma
EV	Endovenosa
Fe	Ferro
g	Grama
HBPz ₃	ânion trispirazolilborato
IL	Intralesional
IM	Intramuscular
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IS	Índice de seletividade
K	Potássio
kg	Quilograma
L	Litro

LC	Leishmaniose cutânea
LCC	Leishmaniose cutânea recidiva cútis
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicanos
LT	Leishmaniose tegumentar
MDAS	<i>Dasypodidae</i>
mg	Miligrama
MHOM	<i>Homo sapiens</i>
mL	Mililitro
Mn	Manganês
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Ministério da Saúde
Na	Sódio
nm	nanomêtro
NMGA	N-metil-glucosamina
NNN	Neal, Novy, Nicolle
NPs	Nanopartículas
NPs	Nanopartículas
NPsBi	Nanopartículas de bismuto
NPsTa	Nanopartículas de tântalo
NTDs	<i>Neglected Tropical Diseases</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PCN	tris-cianometilfosfina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pd	Paládio
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

Sb ³⁺	Antimônio trivalente
Sb ⁵⁺	Antimônio pentavalente
SFBi	Soro fetal bovino inativado
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
Ta	Tântalo
TA	Temperatura ambiente
WHO	World Health Organization
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	Histórico da Leishmaniose	23
2.2	O gênero <i>Leishmania</i>	24
2.3	Os vetores.....	26
2.4	Os hospedeiros	28
2.5	Ciclo Biológico	29
2.6	Aspectos imunopatológicos.....	30
2.7	Leishmaniose Tegumentar (LT).....	32
2.7.1	Leishmaniose Cutânea (LC)	32
2.7.2	Leishmaniose Mucocutânea (LMC)	33
2.8	Diagnóstico.....	36
2.9	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar	37
2.10	Tratamento da Leishmaniose Tegumentar	39
2.10.1	Antimonial Pentavalente	40
2.10.2	Anfotericina B.....	41
2.10.3	Pentamidina	43
2.10.4	Pentoxifilina.....	43
2.10.5	Protocolo Terapêutico	44
2.10.6	Drogas Alternativas no Tratamento da Leishmaniose	46
2.10.7	Impactos Econômicos do Tratamento da Leishmaniose.....	46
2.11	Metalômica e Química Inorgânica Medicinal	48
2.11.1	Química de compostos de coordenação	50
2.11.2	Nanopartículas metálicas	52
2.11.3	Metais de transição na biomedicina.....	53
2.11.3.1	Cobre	53

2.11.3.2	Paládio.....	55
2.11.3.3	Tântalo.....	55
2.11.3.4	Bismuto	56
2.12	Vias alternativas de tratamento na Leishmaniose Tegumentar	57
2.12.1	Pomadas.....	58
3	OBJETIVOS.....	60
3.1	Objetivo geral.....	60
3.2	Objetivos específicos.....	60
4	METODOLOGIA	62
4.1	Síntese das substâncias.....	62
4.1.1	Síntese do complexo de cobre(I)	62
4.1.2	Síntese dos complexos de paládio	62
4.1.3	Síntese das nanopartículas de tântalo (NPsTa)	64
4.1.4	Síntese das nanopartículas de bismuto (NPsBi).....	64
4.2	Aspectos Éticos	64
4.3	Estudo pré-clínico <i>in vitro</i>	65
4.3.1	Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária.....	65
4.3.2	Curva de Crescimento.....	65
4.3.3	Esquema de ensaios biológicos.....	67
4.3.4	Ensaio biológico com formas promastigota.....	68
4.3.5	Ensaio biológico de citotoxicidade	68
4.3.6	Ensaio biológico com formas amastigotas.....	70
4.4	Estudo pré-clínico <i>in vivo</i> com complexo de cobre(I)	70
4.4.1	Formulação tópica com complexo de cobre(I)	70
4.4.2	Procedência dos animais de experimentação	72
4.4.3	Infecção experimental.....	72
4.4.4	Delineamento Experimental	72

4.4.5	Tratamento e avaliação do curso clínico da infecção	73
4.4.6	Eutanásia	73
4.5	Estudo pré-clínico <i>in vivo</i> com NPsTa	73
4.5.1	Procedência dos animais de experimentação	73
4.5.2	Infecção experimental	74
4.5.3	Delineamento Experimental	74
4.5.4	Tratamento e avaliação do curso clínico da infecção	74
4.5.5	Eutanásia	74
4.6	Diagnóstico parasitológico	75
4.6.1	Método direto (impressão por aposição em lâmina - <i>imprint</i>).....	75
4.6.2	Método de cultivo	75
4.6.3	Análise Estatística.....	75
Capítulo 1	77
Capítulo 2	105
Capítulo 3	121
Capítulo 4	139
5 DISCUSSÃO GERAL.....		154
6 CONCLUSÃO GERAL		157
REFERÊNCIAS		159

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças assolam a humanidade desde a antiguidade até os dias atuais e a concentração destas nos trópicos fez com que fossem denominadas “doenças tropicais negligenciadas” (*Neglected Tropical Diseases* - NTDs). Esta denominação está em uso desde o século XIX e refere-se a doenças que afetam principalmente, mas não exclusivamente, países em desenvolvimento que possuem populações pobres em que as condições de moradia, estrutura sanitária e alimentação são precárias, além da dificuldade no acesso aos sistemas de saúde (ANDRADE, 2015).

Essa denominação também é utilizada para fazer referência a doenças que não recebem atenção por parte do governo, não despertam interesse econômico das indústrias farmacêuticas e não recebem investimentos sólidos e contínuos em pesquisa e desenvolvimento que possam levar à prevenção ou a cura. Em vista dessa situação, há uma falha institucional que acaba por comprometer o desenvolvimento de fármacos para essas doenças (BOECHAT; MAGALHÃES, 2012; FERES *et al.*, 2016).

Segundo a *World Health Organization* - WHO (2017) há 20 doenças consideradas negligenciadas, sendo elas: esquistossomose, oncocercose, filariose linfática, tracoma, boubá, verminoses, dracunculose, tripanossomíase africana, hanseníase, cisticercose, equinococose, doença de chagas, úlcera de buruli, dengue, chikungunya, raiva, micetoma, sarna, picada de cobra e leishmaniose; ao menos seis dessas doenças ocorrem no Brasil, dentre elas a leishmaniose (BODIMEADE; MARKS; MABEY, 2019).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença que apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo classificada em leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. Segundo a WHO (2021), a LT está presente em 92 países, dentre estes, o Brasil apresenta-se endêmico com notificação em todos os estados, tendo registrado 16.135 casos em 2019 e na região norte do país o registro foi de 7.123 casos (SINAN/SVS/MS, 2021).

A doença é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que são protozoários intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). As principais formas deste parasita são as formas promastigotas, encontradas no inseto vetor e as formas amastigotas, encontradas em fagócitos mononucleares dos hospedeiros (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017).

Os vetores são fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*; estes são conhecidos popularmente como mosquitos-

palha, cangalhinha ou birigui (GALATI *et al.*, 2017). Há registros de animais silvestres, domésticos e sinantrópicos, que desempenham a função de reservatórios em diferentes localidades; sendo considerada acidental a transmissão para animais domésticos e humanos (PATZ *et al.*, 2000; ROHOUSOVA *et al.*, 2015; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

Devido à diversidade de espécies de *Leishmania*, hospedeiros e vetores, o Ministério da Saúde (MS) fez modificações no esquema terapêutico a ser adotado para o tratamento da leishmaniose, determinando a utilização de antimoniato de meglumina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, isetionato de pentamidina e a pentoxifilina. A escolha do fármaco e administração do mesmo irá depender das manifestações clínicas do paciente, da espécie envolvida, da resposta ao tratamento e disponibilidade de medicamentos (BRASIL, 2017).

Neste sentido, é perceptível que ainda há limitações no esquema terapêutico, devido à baixa eficácia dos medicamentos, alta toxicidade, tratamento longo e doloroso, alto custo financeiro e resistência parasitária. Sendo assim, justifica-se a busca por novos princípios ativos que possam atuar de forma eficaz no tratamento da doença (BASTOS *et al.*, 2016).

A química inorgânica medicinal é o campo de conhecimento que estuda as funções, metabolismo e aplicações de íons inorgânicos em sistemas biológicos, visando à aplicação no diagnóstico e na terapêutica de doenças. Os metais são utilizados para “poções” desde as civilizações antigas e diversos metais já foram utilizados no campo farmacêutico devido ao alto potencial de atividade terapêutica, entretanto, é necessário que haja precaução e que seu uso seja realizado de forma cautelosa, visto que os mesmos podem causar toxicidade ao organismo (MAGNER, 2005; THOMPSON; ORVIG, 2006; BRADFORD; COWAN, 2014; MJOS; ORVIG, 2014).

Nesse contexto, a aplicação dos conhecimentos da química de coordenação e desenvolvimento de tecnologias como as nanopartículas, podem oferecer perspectivas quanto à melhora na eficácia da distribuição do fármaco e diminuição da toxicidade no organismo (BARRY; SANDLER, 2013; BRADFORD; COWAN, 2014). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar em sistemas *in vitro* e *in vivo* a atividade antileishmania de complexos e nanopartículas metálicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade e existem relatos de estudos arqueológicos que demonstram que durante a era pré-colombiana os incas reproduziram figuras humanas mutiladas por diferentes moléstias em vasos de cerâmica, certificando a ocorrência da *uta* e *espúndia* - denominações locais para leishmaniose tegumentar, que inicialmente foi confundida com sífilis (VALE; FURTADO, 2005). Posteriormente estudos da paleomedicina apresentaram descobertas a respeito de múmias com lesões na pele e mucosa com características de leishmaniose tegumentar (SANTOS; COIMBRA, 1994; NEVES, 2009).

No Brasil, no entanto, não foi possível fazer a constatação da presença de leishmaniose através do estudo de cerâmicas antropomórficas produzidas por indígenas, por apresentarem um caráter rudimentar. Sendo assim, a única indicação fidedigna e mais antiga da leishmaniose no Brasil é apresentada em 1908, na tese de Tello, “*Antigüedad de la syphilis em el Peru*”, referente à obra escrita, *Pastoral Religioso-Político Geographico*, editada em 1827, que descreve a viagem de um missionário pela região amazônica. Na obra são descritas observações feitas a respeito de indivíduos que apresentavam úlceras nos braços, pernas e lesões destrutivas na boca e nariz, sendo observado que o mesmo acontecia após a picada de insetos (VALE; FURTADO, 2005).

Inicialmente acreditava-se que a doença era proveniente do Peru e da Bolívia, apesar de apresentar-se endêmica na Amazônia. A doença teria se disseminado nos estados do norte e no restante do país por indivíduos que para lá se dirigiram em busca de trabalho nos seringais e que retornaram infectados a suas origens. Em 1855, Cerqueira observou fortes evidências da leishmaniose no Brasil, devido a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. No final do século XIX, Breda diagnosticou imigrantes italianos ao retornarem de uma viagem feita a São Paulo com uma doença chamada ‘*buba brasiliana*’ (VALE; FURTADO, 2005).

Em 1909, Lindenberg, descreveu os primeiros casos no Brasil, encontrando formas de *Leishmania* idênticas às encontradas no Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo e sugeriu a denominação “leishmaniose ulcerosa” (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003). Entretanto, devido às

manifestações ulcerosas, vegetativas e infiltrantes, Rabello propôs a expressão ‘leishmaniose tegumentar’ (VALE; FURTADO, 2005).

Em 1911, Gaspar de Oliveira Vianna denominou e descreveu o agente etiológico *L. braziliensis* e em 1912 descobriu a cura das leishmanioses pelo tártaro emético (NEVES, 2009). Até a década de setenta, todos os casos de LT eram atribuídos a *L. braziliensis* e a classificação dos parasitas baseava-se no comportamento clínico-evolutivo, visto que a morfologia dos parasitas à microscopia óptica não permitia sua distinção (VALE; FURTADO, 2005). As classificações mais utilizadas na atualidade seguem o modelo taxonômico proposto por Lainson & Shaw (1987), que dividem as leishmanias nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Os primeiros conhecimentos sobre os transmissores foram em 1921, que Sergent conseguiu transmitir o botão do oriente inoculando triturados de *Phlebotomus papatasi* em soldados. Cerqueira (1920) e Aragão (1922) conseguiram infectar um cão a partir de fêmeas de *Lutzomyia intermedia* que haviam realizado repasto sanguíneo de um paciente com leishmaniose tegumentar. Atualmente, é conhecido um grande número de espécies de *Lutzomyia* responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas (NEVES, 2009).

Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas e as características clínicas e geográficas da doença foram sendo complementadas pelo estudo do comportamento das diferentes espécies de *Leishmania*, dos hospedeiros e vetores, fortalecendo a base para a classificação e compreensão desta enfermidade (ALTAMIRANO-ENCISO, 2003; MONTEIRO, 2013).

2.2 O gênero *Leishmania*

Os parasitas que causam as leishmanioses são protozoários que apresentam a classificação taxonômica descrita na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do gênero *Leishmania*.

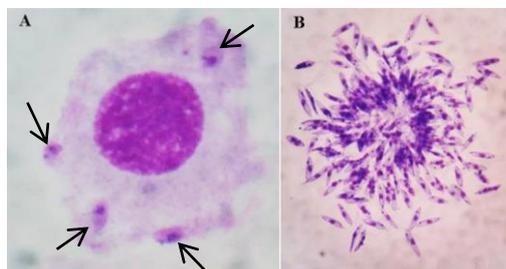
Reino	Protista	Haeckel, 1866
Sub-reino	Protozoa	Goldfuss, 1817
Filo	Sarcomastigophora	Honigberg & Balamuth, 1963
Sub-filo	Mastigophora	Desing, 1866
Classe	Zoomastigophorea	Calkins, 1909
Ordem	Kinetoplastida	Honigberg, 1963, Vickerman, 1976
Sub-ordem	Trypanosomatida	Kent, 1880
Família	Trypanosomatidae	Doflein, 1901, Grobben, 1905
Gênero	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903
Subgêneros	<i>Viannia</i>	Lainson & Shaw, 1987
	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903, Saf'janova, 1982
Espécie	<i>Leishmania</i> spp.	

Fonte: Levine, 1980; Neves, 2009.

Sabe-se que existem aproximadamente 53 espécies de *Leishmania*; ao menos 31 são parasitas de diferentes espécies de mamíferos e cerca de 20 espécies são patogênicas para humanos (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). São protozoários flagelados que possuem um ciclo de vida heteroxênico, que envolve inseto vetor e hospedeiro mamífero. Estes parasitas apresentam uma diversidade de morfologia celular que sofrem adaptações ao longo do ciclo de vida para que o parasita tenha sucesso no desenvolvimento nos hospedeiros (SUNTER; GULL, 2017).

O parasita exibe duas formas morfológicas principais em seu ciclo de vida; a forma amastigota (Figuras 1A) e a forma promastigota (Figura 1B).

Figura 1 – Formas amastigotas (A) interiorizadas em macrófago e formas promastigotas (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: Próprio autor (2021).

As principais diferenças são:

- **Amastigotas:** são encontradas nos hospedeiros vertebrados parasitando células do sistema mononuclear fagocitário (intracelular), possuem formato arredondado ou ovalado (3 μm de largura e 6 μm de comprimento) e apresentam flagelo imóvel que possui especialmente funções sensoriais (GLUENZ *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017);
- **Promastigotas:** são encontradas no intestino dos vetores invertebrados ou em meio de cultivo em laboratórios (extracelular), apresentam formato ovoide alongado (6 e 8 μm) e possuem flagelo livre que tem como principal função fornecer força propulsora, possivelmente para facilitar o percurso através do trato digestivo do inseto vetor (CUVILLIER *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017).

Apesar das diferenças morfológicas entre as formas amastigota e promastigota, vale ressaltar que a arquitetura celular básica é conservada nas duas formas durante o seu ciclo de vida (TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017).

2.3 Os vetores

Os flebotomíneos (Figura 2) são insetos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Estes têm sido amplamente estudados visto que desempenham importante papel como transmissores de diversos agentes patogênicos aos humanos, incluindo diferentes espécies de *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; GALATI *et al.*, 2017).

Figura 2 – Inseto vetor (Diptera: Psychodidae).



Fonte: Bari e Rahmana (2008).

Atualmente foi descrito aproximadamente mil espécies de flebotomíneos em todo o mundo, embora essas classificações permaneçam sem uma padronização das terminologias e caracteres, existem pelo menos 464 espécies no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo (AKHOUNDI *et al.*, 2016; GALATI *et al.*, 2017). Dessas espécies já descritas são conhecidas 50 espécies dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) que são responsáveis pela transmissão de *Leishmania* sp. aos hospedeiros, incluindo o homem (BARI; RAHMANA, 2008).

Esses insetos são pequenos (1 a 3 mm de comprimento) e tem como características o corpo e asas cobertas de cerdas, coloração castanho claro ou cor de palha, o voo consiste em pequenos saltos, quando pousados permanecem com as asas entreabertas e a atividade é noturna ou crepuscular. Popularmente são conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, birigui, cangalha, cangalhinha, entre outros (BRASIL, 2013).

Fatores ambientais como clima, precipitação, umidade e temperatura, afetam diretamente a distribuição, metabolismo e interações desses vetores com as diferentes espécies de *Leishmania*, sendo essencial que encontrem condições climáticas favoráveis para a sua expansão geográfica (HLAVACOVA; VOTYPRA; VOLF, 2013; RANGEL *et al.*, 2018).

Esses insetos possuem predileção por ambientes ricos em matéria orgânica em decomposição, com bom teor de umidade, pouca ou nenhuma luz, tendo como pontos de refúgio folhas caídas no solo da floresta, troncos de árvores com raízes tabulares, fendas em rochas, tocas de animais selvagens, cavernas, entre outros. Porém, devido às modificações ambientais realizadas por atividades humanas, algumas espécies de flebotomíneos estão se adaptando a ambientes urbanos e periferias das grandes cidades, tendo como abrigos artificiais os galinheiros, chiqueiros, currais e outros (DE AGUIAR; VIERA, 2018).

Sabe-se, além disso, que a umidade relativa do ar é um fator determinante para a manutenção desses insetos, dessa forma, durante as primeiras chuvas ocorre o aumento da umidade do ar, favorecendo o surgimento das formas adultas de flebotomíneos (DE AGUIAR; VIERA, 2018).

Em geral, ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e se alimentam de açúcar de plantas; entretanto, as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Sendo assim, o flebotomíneo fêmea pode ser infectado quando realiza o repasto sanguíneo em um mamífero previamente infectado. Habitualmente cada espécie de flebotomíneo possui uma especificidade para uma determinada espécie de *Leishmania*, entretanto tem sido observadas modificações e adaptações do vetor e do agente etiológico nesse sentido (BARI; RAHMANA, 2008; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que a competência vetorial é um fator determinante para a transmissão da *Leishmania*, visto que há múltiplos hospedeiros nas áreas endêmicas de leishmaniose (QUINNEL; DYE; SHAW; 1992; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

2.4 Os hospedeiros

Os hospedeiros vertebrados são de fundamental importância para manter o ciclo de vida das espécies de *Leishmania* (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Entretanto as espécies de hospedeiros apresentam variações regionais e temporais, sendo necessário um estudo de área para determinar quais animais estão desempenhando a função de reservatório em um determinado ambiente (RAYMOND *et al.*, 2003; ROQUE; JANSEN, 2014). Há registros de animais silvestres, domésticos e sinantrópicos, dentre eles estão: roedores, raposas, chacais, lobos, morcegos, primatas, tatus, preguiças, tamanduás, cães, gatos e outros animais que desempenham essa função de reservatórios em diferentes localidades (ROHOUSOVA *et al.*, 2015).

A transmissão para animais domésticos e humanos é considerada acidental, pois a infecção destes ocorre apenas quando há alteração da ecologia local através de desmatamento para construções, serviços profissionais e outras atividades em que o homem passe a conviver ou morar em regiões selvagens que possuam o ciclo biológico da *Leishmania* (PATZ *et al.*, 2000; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017), portanto, a infecção dos humanos está diretamente associada as alterações ambientais efetuadas pelos mesmos (ORYAN; AKBARI, 2016).

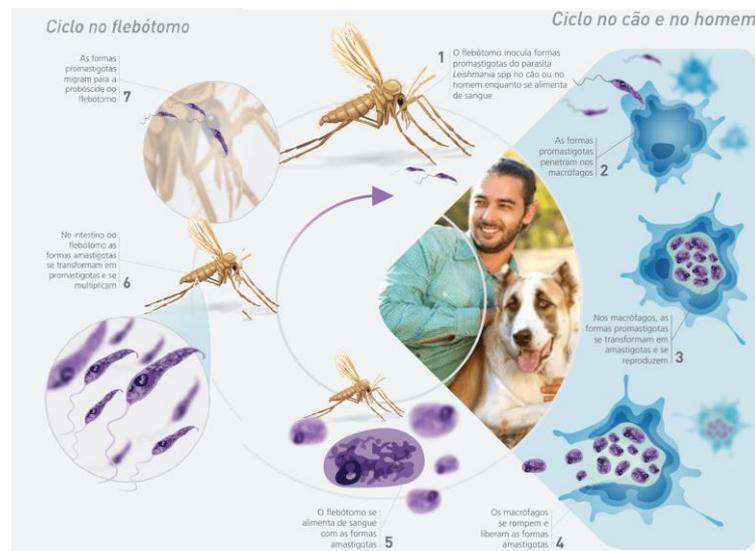
2.5 Ciclo Biológico

Durante o repasto sanguíneo ocorre a infecção do flebotomíneo (fêmea) ao ingerir células (principalmente macrófagos) contendo formas amastigotas de hospedeiros previamente infectados com *Leishmania*. Após a ingestão as formas amastigotas se libertam do macrófago no trato digestório do vetor e na região anterior do trato digestório no interior da matriz peritrófica as formas amastigotas passam por um processo de diferenciação para as formas promastigotas procíclicas. Não se sabe ao certo quais os mecanismos e influências para que ocorram essas modificações, porém acredita-se que as mudanças sejam influenciadas por uma combinação de temperatura, pH e desencadeadores químicos (TEIXEIRA *et al.*, 2013; SUNTER; GULL, 2017).

Após o processo de transformação as formas promastigotas rompem a matriz peritrófica e migram para o epitélio do trato digestório, onde passam pelo processo de divisão celular e aderência pelo flagelo. Posteriormente essas formas migram para a válvula estomodeal localizada na região anterior do intestino, nesse momento as formas promastigotas sofrem o processo de metaciclogênese, que consiste em uma redução do tamanho das formas promastigotas, tornando-se extremamente móveis e altamente infectivas, sendo denominada promastigota metacíclica. Após passar por esse processo as formas promastigotas irão migrar para o probóscide do flebotomíneo e durante um novo repasto sanguíneo as promastigotas são inoculadas nos hospedeiros vertebrados (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Durante o repasto sanguíneo ocorre uma série de fatores que induzem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos e estes irão fagocitar as promastigotas que foram inoculadas. No interior dos vacúolos parasitóforos dentro dos macrófagos as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas que aderem à membrana interna do vacúolo e iniciam o processo de divisão celular até ocupar uma grande área do macrófago. Em seguida, a membrana do macrófago sofre lise liberando as formas amastigotas que poderão invadir novos macrófagos ou serão ingeridas por uma nova fêmea de flebotomíneo, iniciando novamente o ciclo biológico da *Leishmania* (Figura 3) (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Figura 3 – Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.



Fonte: Leevre (2015).

2.6 Aspectos imunopatológicos

A relação parasita/hospedeiro irá determinar a sobrevivência do parasita e evolução da infecção, sendo isto determinado principalmente por condições inerentes ao hospedeiro como a resposta imune e polimorfismos genéticos; entretanto, a evolução e gravidade da doença estão também associadas à espécie de *Leishmania* envolvida (ROSSI; FASEL, 2017).

Após a transmissão ao mamífero, os parasitas necessitam localizar rapidamente células hospedeiras, visto que são parasitas intracelulares obrigatórios, desta forma, as promastigotas interagem em contato direto com o sistema imune do hospedeiro e buscam fugir ou modular esse sistema de forma a garantir a sua sobrevivência (SCOTT; NOVAIS, 2016; ROSSI; FASEL, 2017).

Após as primeiras horas de infecção o parasita se beneficia das propriedades pró-inflamatórias da saliva do flebotomíneo que desempenha um papel fundamental na quimioatração de células do sistema fagocitário. Atualmente, sabe-se que neutrófilos, monócitos e macrófagos estão envolvidos em respostas distintas no combate ao parasita, entretanto, não se sabe em sua totalidade quais são os mecanismos utilizados por essas células, além disso, essas respostas podem resultar na eliminação do parasita ou contribuir para a patogênese da doença (CHAGAS *et al.*, 2014; ROSSI; FASEL, 2017).

Sugere-se que inicialmente os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da infecção, onde irão atuar na liberação das chamadas “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (AEN) que tem por finalidade causar danos ao parasita levando a morte dos mesmos, porém, essa resposta mediada pelos neutrófilos torna-se contraditória, pois não é uma resposta eficiente para todas as espécies. De fato, em quanto que parasitas da espécie *L. amazonensis* são eficientemente mortos pela AEN, as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. mexicana* se beneficiam para progressão da infecção (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Outra resposta imune realizada pelos neutrófilos (vivos ou necróticos) está associada à capacidade de induzir os macrófagos a produzir espécies reativas de oxigênio que irão atuar no controle parasitário. Esse mecanismo é eficiente em espécies como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, entretanto em infecções causadas por *L. major*, esse mecanismo atua na melhor sobrevivência do parasita (ROCHAEL *et al.*, 2015; SCOTT; NOVAIS, 2016).

Nos primeiros dias de infecção os monócitos inflamatórios são as células que apresentam maior infecção pelos parasitas de *Leishmania*. A resposta dos monócitos a infecção envolve uma forte explosão respiratória, sendo eficientes em controlar a carga parasitária e matar os parasitas através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, estando também associados ao possível controle em casos de reinfecção. Além disso, os monócitos podem estar associados também à promoção da diferenciação de células TH1 que irão migrar para a pele e eliminar os parasitas através do aumento da explosão respiratória ou produção do óxido nítrico (ON). Entretanto, a eficácia dessas respostas mediada pelos monócitos também pode ser dependente da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Apesar desses mecanismos de resposta imune mediada pelos neutrófilos e monócitos os parasitas conseguem sobreviver e a infecção duradoura no hospedeiro ocorre de fato dentro dos macrófagos. Nesta célula, os parasitas conseguem se diferenciar das formas promastigotas para amastigotas, isso ocorre especialmente devido o revestimento que possuem de lipofosfoglicanos (LPG) que protege o parasita da temperatura hostil e ácida dentro dos macrófagos, além disso, esse revestimento retarda a formação do fagolisossomo (SCOTT; NOVAIS, 2016).

A atuação dos macrófagos nas primeiras horas de infecção está associada à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que tem como objetivo eliminar patógenos invasores sem danificar a célula hospedeira, entretanto os parasitas desenvolveram diversos mecanismos para interferir nesses processos, dentre eles o LPG atua novamente na proteção

das formas amastigotas retardando e suspendendo a produção das espécies reativas de oxigênio. Ou seja, os parasitas conseguem moldar a resposta imune desde a sua entrada no organismo hospedeiro até a sua sobrevivência e reprodução dentro dos macrófagos, comprometendo tanto a imunidade inata quanto a adaptativa (ROSSI; FASEL, 2017).

2.7 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT manifesta-se sob as formas leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC), que podem apresentar manifestações clínicas diferenciadas que estão associadas geralmente à espécie do parasita envolvido, ao estado imunológico e genético do indivíduo afetado (MARTINS *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

2.7.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

A LC é a forma menos severa da doença e possui um período de incubação que varia entre duas semanas a dois meses. A úlcera típica é geralmente indolor e são geralmente encontradas em áreas descobertas do corpo, apresentando como características lesões ulcerativas ou nodulares, de formato arredondado ou ovalado, com bordas bem delimitadas, com base eritematosa, infiltrada e granulações grosseiras (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017). O Ministério da Saúde (2017) classifica a LC em:

a. Forma cutânea localizada (LCL): lesão geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla e tem como característica acometimento primário da pele (Figura 4A);

b. Forma cutânea disseminada (LD): múltiplas lesões papulares, de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais envolvendo com frequência a face e o tronco. A disseminação do parasita provavelmente ocorre por via hemática ou linfática, causando lesões distantes do local de inoculação do parasita (Figura 4B);

c. Forma recidiva cútis (LCC): após cicatrização, há uma ativação da lesão nas bordas, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial. A resposta terapêutica costuma ser inferior à da lesão primária (Figura 4C);

d. Forma cutânea difusa (LCD): inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; posteriormente evolui de forma lenta com formação de placas e

múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas. Essa forma clínica é rara e grave, pois não apresenta resposta à terapêutica e ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune (Figura 4D).

Figura 4 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose cutânea localizada (A); disseminada (B); recidiva cútis (C) e difusa (D).



Fonte: Brasil (2017).

Dentro das classificações já descritas, deve-se considerar que as lesões de LC apresentam polimorfismo, sendo assim, há vários tipos de lesões menos frequentes que podem ser encontradas nos pacientes como: lesão tipo pápula, lesão em placa, úlcera franca, impetigóide, ectimatoide, nodular, úlcero-vegetante e lesão verrucosa (Figura 5) (NAIFF JÚNIOR *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

Figura 5 – Polimorfismo das lesões de Leishmaniose cutânea. Lesão tipo pápula (A); lesão em placa (B); úlcera franca (C); impetigóide (D); ectimatoide (E); nodular (F); úlcero-vegetante (G) e lesão verrucosa (H).



Fonte: Naiff Júnior *et al.* (2009).

2.7.2 Leishmaniose Mucocutânea (LMC)

A leishmaniose mucocutânea (LMC) tem como característica lesões destrutivas das mucosas e geralmente o acometimento é da mucosa nasal, entretanto podem ocorrer lesões na orofaringe, palato, lábios, língua, laringe, traqueia e árvore respiratória superior; de forma mais rara pode ocorrer o comprometimento de conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais e ânus (BRASIL, 2017).

Sabe-se que a forma clássica da LMC pode ocorrer de forma secundária a lesões inicialmente cutâneas em que o paciente não teve o tratamento adequado ou teve cura espontânea e posteriormente houve uma evolução crônica para a forma mucosa. O acometimento por LMC não é bem compreendido, acredita-se que possa ser um resultado de uma interação complexa de fatores entre hospedeiro e parasita (BRASIL, 2017).

O Ministério da Saúde (2017) classifica as manifestações clínicas de LMC em:

a. Forma mucosa tardia: está associada à evolução de lesões cutâneas múltiplas em que não há cura espontânea ou não é responsiva ao tratamento, sendo esta a forma mais comum (Figura 6A);

b. Forma mucosa sem lesão cutânea prévia: essa forma está associada a infecções subclínicas ou lesões cutâneas pequenas que teriam passado despercebidas sem deixar cicatrizes perceptíveis (Figura 6B);

c. Forma mucosa concomitante: quando lesões na mucosa e lesões cutâneas estão ativas ao mesmo tempo (Figura 6C);

d. Forma mucosa contígua: ocorre por propagação direta de lesão cutânea localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas (Figura 6D);

e. Forma mucosa primária: ocorre eventualmente pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios (Figura 6E).

Figura 6 – Classificação das apresentações clínicas da leishmaniose mucocutânea mucosa tardia (A); mucosa sem lesão cutânea prévia (B); mucosa concomitante (C); mucosa contígua (D) e mucosa primária (E).



Fonte: Brasil (2017).

As diferentes manifestações clínicas se dão em grande parte pela diversidade de espécies de *Leishmania*. Nas Américas são conhecidas 13 espécies e ao menos sete espécies estão relacionadas com a LT no Brasil, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* (TELES, *et al.*, 2016).

Considerando o estado do Amazonas, sabe-se que circulam pelo menos quatro espécies conhecidas, sendo elas: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, que são responsáveis por diferentes manifestações clínicas da LT (Tabela 2) (FIGUEIRA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2013; BRASIL, 2017).

Tabela 2 – Relação entre manifestações clínicas e espécies de *Leishmania* no Novo Mundo.

	Subgênero <i>Leishmania</i>	Subgênero <i>Viannia</i>
Leishmaniose cutânea	<i>L. infantum chagasi</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>
	<i>L. pifanol</i>	<i>L. naiffi</i>
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. peruviana</i>
		<i>L. lainsoni</i>
		<i>L. lindenbergi</i>
		<i>L. shawi</i>
Leishmaniose cutânea disseminada	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. mexicana</i>	
	<i>L. amazonensis</i>	
Leishmaniose mucocutânea		<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. panamensis</i>

Fonte: Teixeira *et al.* (2013).

2.8 Diagnóstico

O correto diagnóstico pode ser desafiador, pois esta doença mimetiza outras diversas condições infecciosas e malignas. Em geral, o diagnóstico de LT baseia-se nas manifestações clínicas do paciente, conhecimento epidemiológico da região e testes laboratoriais (HANDLER *et al.*, 2015). Numerosos métodos de diagnóstico podem ser utilizados com uma grande variação na precisão, incluindo exames parasitológicos, imunológicos e diagnósticos moleculares. Entretanto, apesar da precisão do exame ser de extrema importância, a seleção do método a ser utilizado geralmente baseia-se na infraestrutura disponível e recursos (GOTO; LINDOSO, 2010; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Os exames parasitológicos possuem alta especificidade e podem incluir exames diretos como a escarificação, biópsia com impressão por aposição em lâmina e punção aspirativa, que permitem a observação das formas amastigotas utilizando técnicas de microscopia; ou métodos indiretos que consistem em realizar o isolamento do parasita em cultivo *in vitro* e em

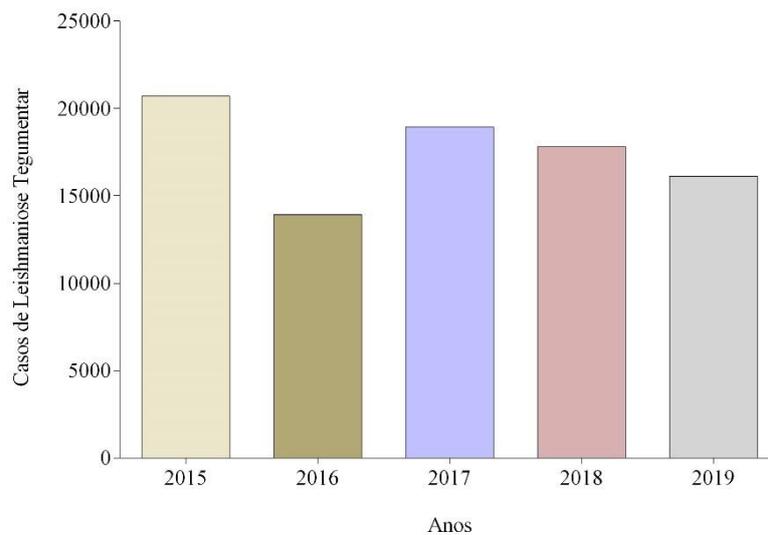
animais de experimentação *in vivo* como o *Mesocricetus auratus* (COMANDOLLI – WYREPKOWSKI, 2015; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Outra forma de realizar o diagnóstico é através da reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), que consiste em um exame molecular que permite amplificar em escala exponencial sequências de ADN (ácido desoxirribonucleico), sendo capaz de detectar quantidades relativamente baixas de ADN do parasita. Apesar de ser uma técnica com alta sensibilidade, as exigências técnicas e o custo limitam a utilização rotineira, sendo assim, os exames parasitológicos direto permanecem como o padrão ouro no diagnóstico da leishmaniose (MURRAY *et al.*, 2005; COMANDOLLI – WYREPKOWSKI, 2015).

2.9 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar

A falta de controle em áreas remotas torna difícil estimar a real incidência, mas sabe-se que causa impacto em 92 países e mais de 1 milhão de pessoas estão em risco. A maioria dos casos de LT ocorre no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã e Síria (DNDi, 2018a). Segundo o Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN (2021) no Brasil houve um total de 16.135 casos de LT em 2019 (Figura 7).

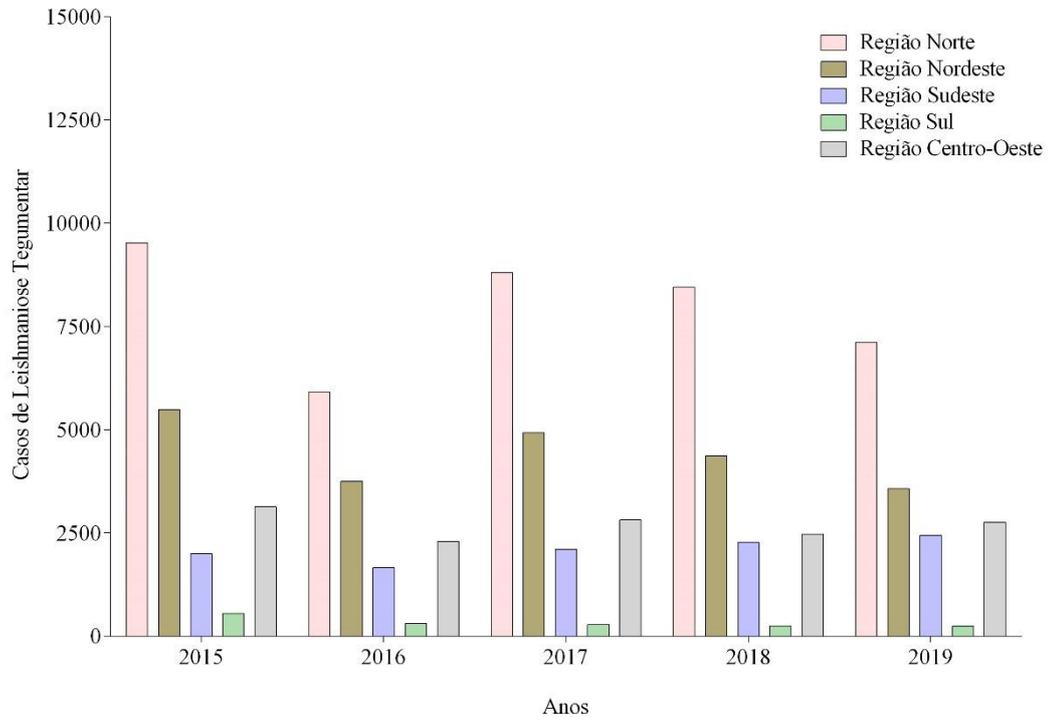
Figura 7 – Casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil (2015 - 2019).



Fonte: SINAN/SVS/MS (2021).

Considerando os casos por notificação nas regiões entre os anos 2015 - 2019, observa-se que neste período de tempo a região norte apresentou maior número de casos, tendo notificado um total de 7.123 casos em 2019 (Figura 8) (SINAN/SVS/MS, 2021).

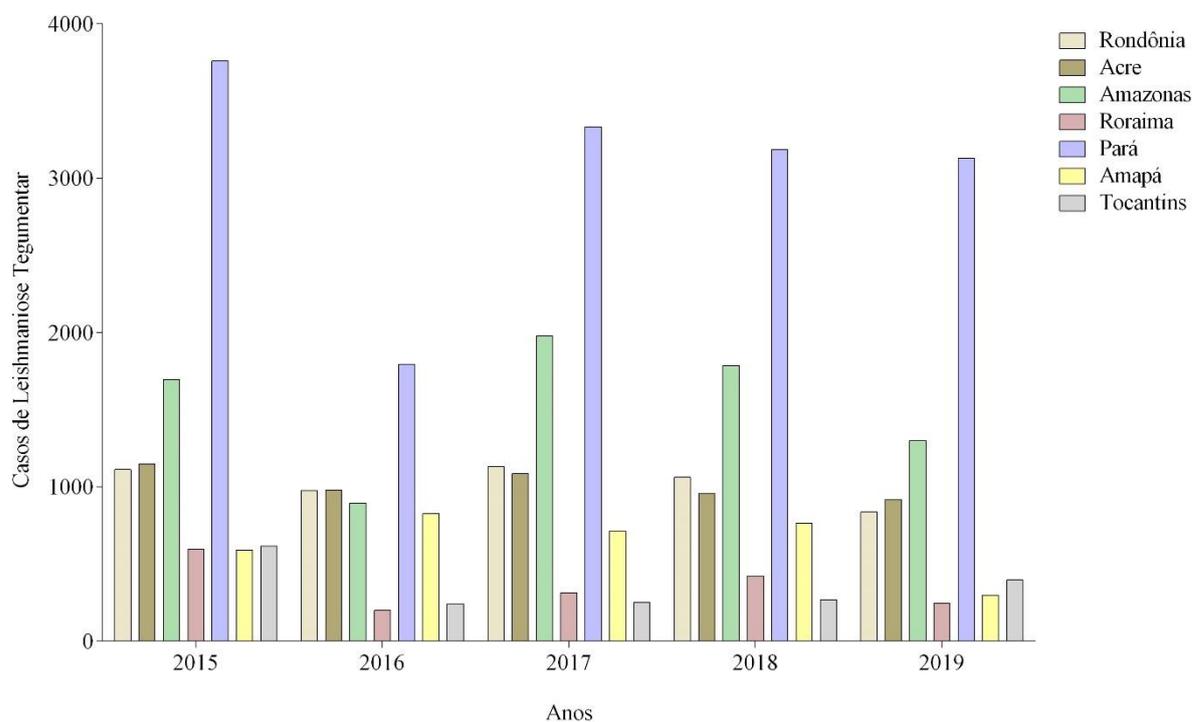
Figura 8 – Casos de Leishmaniose Tegumentar nas Regiões Brasileiras (2015 - 2019).



Fonte: SINAN/SVS/MS (2021).

Na Região Norte as Unidade Federativas que apresentaram maior número de casos em 2019 foram o Pará (3.130 casos), Amazonas (1.300 casos) e Acre (916 casos) (Figura 9) (SINAN/SVS/MS 2021).

Figura 9 – Casos de Leishmaniose Tegumentar na Região Norte (2017).



Fonte: SINAN/SVS/MS (2021).

Historicamente a LT foi considerada uma “doença profissional”, ou seja, relacionada à profissão de pessoas que adentravam ambientes florestais. Entretanto sua epidemiologia tem sofrido uma considerável modificação nas últimas décadas em consequência da proximidade das zonas urbanas com as áreas florestais, ocorrendo uma adaptação do vetor a ambiente peridomiciliar (BARI; RAHMANA, 2008; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Um agravante a esta situação são as medidas de prevenção que não mudam há décadas, atualmente nenhuma vacina está disponível, desta forma, as medidas de controle e prevenção restringem-se a profilaxia pessoal como o uso de repelentes ou mosquiteiros, controle e limpeza de ambientes visando erradicar os flebotomíneos e controle canino ou de outros possíveis hospedeiros em região peridomiciliar. Em vista disso, o intuito é o desenvolvimento de vacinas e medicamentos que possam ser eficazes em prevenir e tratar a leishmaniose (REDDY, 2019).

2.10 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar

A problemática envolvida no combate as infecções causadas pela LT está no seu tratamento. Atualmente os medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde são

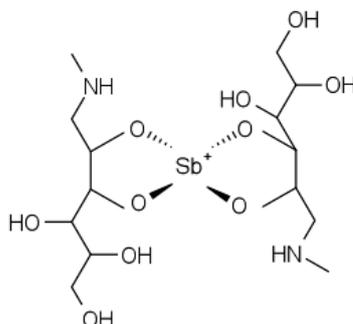
antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e pentoxifilina (BRASIL, 2017; CARGNIN, 2017).

2.10.1 Antimonial Pentavalente

Em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna descobriu a cura das leishmanioses pelos sais de antimônio trivalente (Sb^{+3}), mais especificamente tartarato de antimônio e potássio emético, entretanto a utilização foi descontinuada devido à alta toxicidade, passando a ser utilizado o antimônio pentavalente (Sb^{+5}) (CARVALHO *et al.*, 2019).

Desde 1940, no Brasil o antimonial pentavalente está disponível na formulação de antimoniato de meglumina (Figura 10), conhecido comercialmente como Glucantime[®] (BRASIL, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

Figura 10 – Estrutura química do antimonial pentavalente (antimoniato de meglumina). BKchem[®].



Fonte: Próprio autor (2021).

O medicamento é apresentado em ampolas de 5 mL contendo 1.500 mg do sal bruto de antimoniato de meglumina, o que equivale a uma concentração do sal bruto de 300 mg/mL. Desta forma, uma ampola corresponde a 405 mg de Sb^{+5} , ou seja, cada mL contém 81 mg de Sb^{+5} (GLUCANTIME[®], 2015; CARVALHO *et al.*, 2019).

As doses e vias de aplicação preconizadas pelo Ministério da Saúde (2017) são 10 a 20 mg/ Sb^{+5} /Kg/dia e a administração deve ser preferencialmente por via endovenosa (EV), podendo também ser administrado por via intramuscular (IM) ou intralesional (IL) (BRASIL, 2017).

As reações adversas comuns reportadas são dores articulares e musculares, náusea e vômito, cefaleia, febre, anorexia, alterações nos testes de função hepática, níveis de lipase e

amilase, leucopenia, anormalidades no eletrocardiograma (ECG). Podendo também ocorrer reações adversas raras como mal estar geral, dispneia, erupção cutânea, edema facial, dor abdominal, e alterações nos testes da função renal, pancreatite e arritmias severas. Vale ressaltar que este medicamento é contraindicado em casos de hipersensibilidade ao antimoniato de meglumina e aos demais componentes do produto e no período de gravidez (GLUCANTIME[®], 2015).

Estudos quanto à farmacocinética do Glucantime[®] apontam que mais que 80% da dose administrada é excretada dentro de 24 horas na urina na forma inalterada. É eliminada em duas fases, na primeira fase, a meia-vida é pequena e aproximadamente de 2 horas e na segunda fase, a meia-vida é mais lenta, cerca de 76 horas (GLUCANTIME[®], 2015).

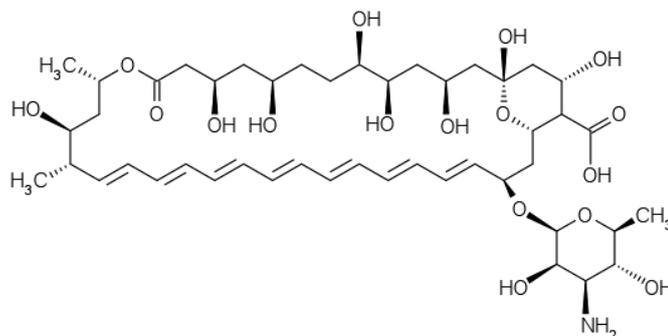
A farmacodinâmica do medicamento permanece incerta. Segundo a bula do Glucantime[®] (2015), pressupõe-se que várias enzimas de *Leishmania* spp. sejam inibidas seletivamente. Esses agentes também parecem inibir a fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de adenosina trifosfato. Outras hipóteses são levantadas na literatura, como I) Mecanismo de oxirredução: o Sb^{+5} pode sofrer redução em sistemas biológicos, levando à formação de compostos de Sb^{+3} , tóxicos ao parasita (DEMICHELI *et al.*, 2002; CHAI *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2019).

Nesta hipótese, os antimoniais podem ser considerados como um pró-fármaco (BASTOS *et al.*, 2016); II) Formação de complexos entre o Sb^{+5} com alguns nucleotídeos: interfere no metabolismo, através da inibição da topoisomerase do parasita (DEMICHELI *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019); III) Formação de complexos entre o Sb^{+5} com alguns glicoconjugados ricos em guanosina 5'-difosfato-D-manose: interfere na virulência do parasita (CHAI *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019); IV) Inibição da enzima superóxido dismutase: ocasiona o aumento do nível de radicais superóxido, com a consequente morte do parasita (RAYCHAUDHURY *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019) e V) Indução de danos ao ADN: o medicamento induz danos ao ADN de células de mamífero infectados por meio da geração de espécies de oxigênio, os quais disparam mecanismos de resposta celular ao estresse oxidativo (MOREIRA, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

2.10.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. No Brasil, estão disponíveis o desoxicolato de anfotericina B (Figura 11) e as formulações lipídicas (BRASIL, 2017).

Figura 11 – Estrutura química do desoxicolato de anfotericina B. BKchem[®].



Fonte: Próprio autor (2021).

O desoxicolato de anfotericina B tem como formulação uma suspensão coloidal e é comercializada em um frasco contendo 50 mg de desoxicolato sódico liofilizado de anfotericina B. A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é 0,7 a 1 mg/Kg/dia e a via de aplicação deve ser EV lenta (BRASIL, 2017).

Dentre os efeitos adversos, os mais comuns estão febre, cefaleia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, comprometimento da função renal, anemia e distúrbios do comportamento (ANFOTERICINA B, 2015). Deve ser ressaltado que este medicamento possui contra indicação em casos de insuficiência renal, hipersensibilidade à anfotericina B ou outro componente da formulação e em casos de gravidez deverá ser empregado com cuidado e somente se os prováveis benefícios a serem obtidos com a medicação prevalecerem sobre os potenciais riscos envolvidos ao feto (ANFOTERICINA B, 2015).

A anfotericina B lipossomal apresenta-se comercialmente em frasco-ampola contendo 50 mg de anfotericina B encapsulada em lipossomas em forma liofilizado estéril para infusão intravenosa, fornecido na forma de pó estéril amarelo-vivo. A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 2 a 5 mg/Kg/dia, por via EV (BRASIL, 2017).

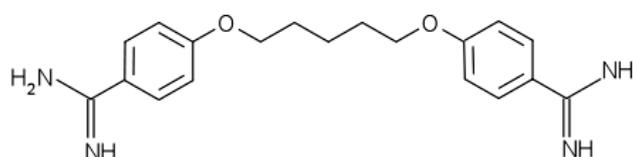
O medicamento é bem tolerado e apresenta como efeitos colaterais mais comuns náusea, vômitos e cefaleia leve. Apresenta contra indicações de uso em pacientes que apresentam hipersensibilidade a qualquer constituinte da formulação e deverá somente ser

utilizado durante a gravidez se os possíveis benefícios se sobrepuserem aos potenciais riscos envolvidos (AMBIOSOME, 2015).

2.10.3 Pentamidina

As pentamidinas são pertencentes às diamidinas aromáticas e o fármaco é apresentado como isetionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina (Figura 12) (BRASIL, 2017).

Figura 12 – Estrutura química do isetionato de pentamidina. BKchem®.



Fonte: Próprio autor (2021).

A apresentação comercial do isetionato de pentamidina (Pentacarinat®) é em frasco - ampola com 300 mg do sal e a dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 3 - 4 mg/Kg/dia por via EV lenta ou IM (BRASIL, 2017).

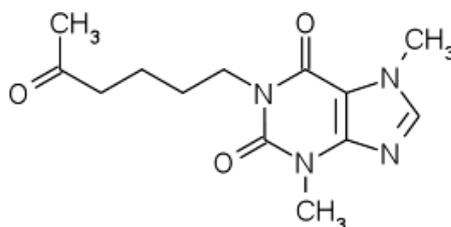
As reações adversas incluem comumente dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação intramuscular, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Devido ao medicamento ter ação tóxica aguda sobre as células beta-pancreáticas, pode haver hipoglicemia durante o tratamento e diabetes mellitus tardio (BRASIL, 2017).

Além das precauções quanto aos efeitos adversos deve ser considerado que o medicamento é contraindicado em caso de gestação, aleitamento, crianças menores de 1 ano, diabetes mellitus, intolerância à glicose, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas ou hipersensibilidade aos componentes do medicamento (BRASIL, 2017).

2.10.4 Pentoxifilina

A pentoxifilina (Figura 13) é um fármaco da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas (BRASIL, 2017).

Figura 13 – Estrutura química da pentoxifilina. BKchem®.



Fonte: Próprio autor (2021).

Sua apresentação comercial é como comprimido revestido, de liberação prolongada, contendo 400 mg de pentoxifilina. Vale a ressalva que este medicamento tem papel como adjuvante, não tem indicação como medicamento isolado, mas sim em associação ao antimoniato de meglumina (BRASIL, 2017).

A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é um comprimido de 400 mg, três vezes ao dia, durante 30 dias por via oral. Tem como principais efeitos adversos flush e distúrbios gastrointestinais, sendo contra indicado em casos de alergia à pentoxifilina e a outras metilxantinas ou a algum de seus excipientes; hemorragias maciças, hemorragia retiniana extensa, durante a gravidez e em crianças (BRASIL, 2017).

2.10.5 Protocolo Terapêutico

O Ministério da Saúde decidiu atualizar as recomendações sobre o manejo dos pacientes com LT (Tabela 3) para a realidade brasileira, desta forma deve-se levar em consideração a forma clínica, a espécie de *Leishmania*, a resposta ao tratamento, a avaliação de risco-benefício ao paciente e a disponibilidade do medicamento a ser utilizado (BRASIL, 2017).

Tabela 3 – Protocolo Terapêutico recomendado pelo Ministério da Saúde.

Protocolo Terapêutico		
Forma Clínica	Espécie	Terapêutica
LCL	<i>Leishmania</i> spp. exceto <i>L. (V.) guyanensis</i>	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina EV ou IM e Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desoxicolato de anfotericina B e Isetionato de pentamidina.
LCL	<i>L. (V.) guyanensis</i>	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isetionato de pentamidina e Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina e Desoxicolato de anfotericina B.
LD	<i>Leishmania</i> spp.	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina EV ou IM e Anfotericina B lipossomal <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Desoxicolato de anfotericina B.
LCD	<i>Leishmania</i> spp.	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isetionato de pentamidina <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antimoniato de meglumina, Desoxicolato de anfotericina B e Anfotericina B lipossomal.
LM	<i>Leishmania</i> spp.	<p>Primeira escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Antimoniato de meglumina (EV ou IM) associado à pentoxifilina, Antimoniato de meglumina (EV ou IM) e Anfotericina B lipossomal. <p>Segunda escolha:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Desoxicolato de anfotericina B e Isetionato de pentamidina.

Fonte: Brasil (2017).

2.10.6 Drogas Alternativas no Tratamento da Leishmaniose

A administração de apenas um medicamento (monoterapia funcional) levou ao desenvolvimento de cepas resistentes, desta forma as combinações de medicamentos tornaram-se alternativas de tratamento. Dentre as diversas combinações terapêuticas, têm recebido destaque as associações de medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde com medicamentos como a miltefosina e paromomicina (ALVAR *et al.* 2006; SUNDAR *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2016).

A miltefosina, originalmente desenvolvida como fármaco antineoplásico, teve o primeiro registro como medicamento oral para leishmaniose em 2002 na Índia (GUERIN *et al.*, 2002; BASTOS *et al.*, 2016). Este medicamento foi avaliado na Colômbia, Guatemala (SOTO *et al.*, 2004) e Bolívia (SOTO *et al.*, 2008) para o tratamento de LC e apresentou uma taxa de cura de 91%, 53% e 88%, respectivamente. Machado *et al.* (2010) realizaram um estudo no Brasil (Bahia) em que demonstram que a miltefosina apresentou maior eficácia no tratamento de pacientes com *L. (V.) braziliensis* quando comparado ao antimoniato de meglumina. Dentre os efeitos adversos causados por este medicamento, os mais comuns incluem distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal (GUERIN *et al.*, 2002).

A paromomicina é um aminoglicosídeo produzido por bactérias do gênero *Streptomyces*. Uma das maiores vantagens do uso da paromomicina é por ser considerado um medicamento de baixo custo, entretanto apresenta desvantagens como os efeitos adversos que incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade e disfunção hepática, além da dificuldade da administração que deve ser feita via parenteral (BASTOS *et al.*, 2016).

2.10.7 Impactos Econômicos do Tratamento da Leishmaniose

As drogas utilizadas no tratamento das doenças negligenciadas são, de um modo geral, inacessíveis as populações mais pobres, dessa forma, em busca de melhorar o fornecimento dos medicamentos, as empresas e a OMS/WHO realizam um esforço em conjunto para que esses medicamentos possam ter custos preferenciais (reduzir o valor ou fornecer a custo de produção) ou até mesmo distribuir através de programas de doação (BOER *et al.*, 2011). O WHO (2010) apresentou o custo de cada fármaco, porém cabe a ressalva de que os valores informados foram negociados conjuntamente com as empresas fabricantes visando à obtenção dos medicamentos por um custo acessível (Tabela 4).

Tabela 4 – Preços de medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose.*

Composto	Nome comercial/Fabricante	Dose	Custo Médio	Custo Médio (R\$)
Antimoniato de Meglumina	Glucantime® Aventis Single Source	Frasco de 5 mL de 81mg/mL	US\$ 1,2	R\$ 6,25
Isetionato de Pentamitina	Pentacarinat® Sanofi	Grátis (Programa de doação)	Grátis (Programa de doação)	Grátis (Programa de doação)
Anfotericina B Desoxicolato	Anfotericina B Unianf	Frasco de 50 mg	US\$ 7,5 por	R\$ 39,08
Anfotericina B Lipossomal	AmBisome® Gilead USA Source	Frasco de 50 mg	US\$ 18	R\$ 93,78
Miltefosina	Impavido® Paladin, Canada Single Source	56 cápsulas (50 mg)	Adultos: € 45,28–54,92 Crianças: € 34,36–39,3	R\$ 279,89 – 339,48 R\$ 212,39 – 242,92
Paromomicina	Paromomicyn® Gland Pharma, India Single Source	Tratamento para 21 dias	US\$ 15	R\$ 78,13

Fonte: Adaptado de WHO (2010).

*Custo médio em Real (R\$) calculado considerando Dólar Americano US\$ 5,21 e o Euro € 6,18, calculado em 1 agosto de 2021.

No Brasil o tratamento para leishmaniose é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), de forma que o diagnóstico e os medicamentos são fornecidos “gratuitamente” a população. Recentemente a miltefosina foi incorporada ao esquema terapêutico para LT no Brasil e foram investidos cerca de 3,5 milhões de reais para a aquisição de 100.976 cápsulas de miltefosina de 50 mg, assim o Ministério da Saúde busca demonstrar os esforços que estão sendo realizados para que mais brasileiros sejam assistidos e tratados com abordagem menos invasivas e mais acessíveis. O conhecimento dessas estimativas é essencial para determinar a formulação de novas políticas para garantir soluções sustentáveis para reduzir os custos do tratamento (SUNYOTO; BOELAERT; MEHEUS, 2018; SVS/MS, 2020).

2.11 Metalômica e Química Inorgânica Medicinal

A metalômica é uma ciência integrada que visa estudar a presença e funcionamento de compostos traço contendo metal e elementos não metálicos em organismos vivos. Através dessa ciência foi comprovado que íons metálicos contribuem criticamente para manutenção e evolução da vida (MARET, 2016).

Recentemente foram descritos cerca de 20 elementos essenciais para o funcionamento adequado do organismo, dentre estes, 10 são elementos metálicos e com base no conhecimento atual constatou-se que metais como sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), manganês (Mn), cobalto (Co), cobre (Cu), zinco (Zn) e molibdênio (Mo) são elementos essenciais, além disso o organismo necessita de quantidades apropriadas para o correto funcionamento (ZORODDU *et al.*, 2019).

A importância dos íons metálicos nos processos biológicos foi sendo descoberta à medida que foram sendo observados que um crescente número de biomoléculas continha ou necessitava de metais em sua estrutura e para o seu funcionamento. Os íons metálicos desempenham papéis cruciais em diversos processos biológicos, sendo componentes essenciais para manter a homeostase humana. Estão envolvidos em processos como equilíbrio de eletrólitos, transporte de oxigênio, transferência de elétrons, catálise, atuação como cofatores na função biológica das proteínas, entre outros (AISEN; ENNS; WESSLING-RESNICK, 2001; ANDREINI *et al.*, 2008; WALDRON *et al.*, 2009; BRADFORD; COWAN, 2014; VAROL, 2016).

Sabe-se que cerca de 30 a 40% de todas as proteínas conhecidas requerem cofatores metálicos, desta forma a saúde, envelhecimento, distúrbios fisiológicos e doenças estão relacionados à presença ou ausência de íons metálicos e seus complexos com biomoléculas no corpo (KASTENHOLZ, 2006; KASTENHOLZ, 2007; SANJAY; SINGH, 2009).

Em geral, os íons metálicos ou os seus compostos apresentam várias funções biológicas que podem ser resumidas em: a) realizar reações difíceis em condições fisiológicas (a maioria dos metais de transição tem a capacidade de fornecer elétrons desemparelhados e doar simultaneamente carga eletrônica); b) realizar transferência de elétrons em pares redox, e estabilizar estados de oxidação “incomum” de metal ativo redox; c) participar na degradação, formação ou metabolismo de compostos orgânicos por sítios metálicos em várias enzimas; c) transferir informações por transportadores de carga e d) participar na formação estrutural de moléculas e em vias de biomineralização (BRADFORD; COWAN, 2014; VAROL, 2016).

Além das funções biológicas, os metais são utilizados para poções farmacêuticas desde as civilizações antigas como a Mesopotâmia, China, Egito e Índia. A ação microbicida dos metais foi uma das atividades mais exploradas pelas primeiras civilizações, tem-se o conhecimento de que os egípcios e gregos utilizavam o cobre e a prata para manter a água pura, os romanos armazenavam vinho em urnas de prata e os australianos utilizaram moedas de cobre e prata em tanques de água ou barris de leite para evitar a deterioração (MEDICI; PEANA; ZORODDU, 2018).

Recentemente, os metais têm sido amplamente estudados e aplicados no diagnóstico e terapia de diversas doenças, e o campo de conhecimento que realiza essa forma de estudo é conhecido como química inorgânica medicinal. Apesar da utilização dos metais ser historicamente comprovada o estudo da química inorgânica medicinal ainda é considerado recente (MAGNER, 2005; THOMPSON; ORVIG, 2006; MJOS; ORVIG, 2014).

Na atualidade, os metais utilizados na medicina para a terapêutica de muitas doenças, são denominados de metalofármacos (*Metallo drugs*). Um dos primeiros metalofármacos foi a arsfenamina, comercializada como Salvarsan[®], um agente antimicrobiano à base de arsênio desenvolvido por Paul Ehrlich, que foi utilizado até a segunda guerra mundial como tratamento padrão para sífilis, entretanto a estrela do campo é o agente anticancerígeno cisplatina (Platinol), que foi descoberto em 1965 (MJOS; ORVIG, 2014).

Outros metais já foram utilizados no campo farmacêutico, por exemplo, a prata já foi utilizada como antibiótico no tratamento de feridas, queimaduras e úlceras (VAROL, 2016); o ouro foi usado para tratar doenças há milhares de anos na China (MAGNER, 2005; KRAATZ; METZLER-NOLTE, 2006; VAROL, 2016); o mercúrio foi administrado sob a forma de cloreto de mercúrio(I) como antisséptico e diurético, o cloreto de mercúrio(II) para o tratamento da sífilis (BRADFORD; COWAN, 2014) e o antimônio(V) permanece como primeira escolha para o tratamento da leishmaniose (CARVALHO et al, 2019).

Além disso, muitas drogas de natureza orgânica não possuem um modo de ação puramente orgânico e necessitam da atuação de vestígios de íons metálicos direta ou indiretamente para ativação ou biotransformação (KASTENHOLZ, 2006; KASTENHOLZ, 2007; SANJAY; SINGH, 2009).

Uma preocupação são as diversas doenças relacionadas à abundância ou deficiência de metal no organismo, podendo ser citadas a hemocromatose (excesso de Fe), anemia (deficiência de ferro), doença de Wilson (excesso de Cu) (LORINCZ, 2010) e a hipozincemia (deficiência de Zn) (TUBEK; GRZANKA; TUBEK, 2008; BRADFORD; COWAN, 2014).

Desta forma, apesar dos íons metálicos apresentarem alto potencial de atividade terapêutica, é necessário que sejam tomadas devidas precauções e que seu uso seja realizado de forma cautelosa quando não houver uma compreensão clara de seu mecanismo de ação, visto que os mesmos podem causar toxicidade ao organismo (BRADFORD; COWAN, 2014).

Apesar da toxicidade ser uma preocupação séria, esta pode ser abordada pelo design adequado dos ligantes, conhecimentos da química de coordenação e desenvolvimento de tecnologias como as nanopartículas; essas abordagens podem oferecer perspectivas interessantes para melhorar a entrega, a captação celular e o direcionamento dos metalofármacos, para torná-los mais eficazes e seguros (BARRY; SANDLER, 2013; BRADFORD; COWAN, 2014).

2.11.1 Química de compostos de coordenação

Antigamente os compostos de coordenação eram considerados um grande desafio para os químicos, devido à dificuldade em compreender como um sal estável como CoCl_3 (cloreto de cobalto) poderia reagir com a amônia em diferentes relações estequiométricas originando novos compostos com coloração diferente. Diversas teorias foram propostas para explicar estes compostos, entretanto, foi Alfred Werner por volta de 1875 e 1915 que deu o ponto de partida para a compreensão dos atualmente chamados “complexos metálicos”, tendo sido assim denominado visto a difícil compreensão do comportamento desses compostos (SANTOS *et al.*, 2014).

Dessa forma, o estudo da química de coordenação iniciou-se a partir das teorias de Alfred Werner e atualmente o enfoque central da química de coordenação é o estudo dos complexos metálicos que consistem em um átomo metal central ou íon metálico ligado a átomos ou grupos de átomos chamados ligantes (do latim *ligare*, que significa “ligar”) que são íons ou moléculas que contêm um ou mais pares de elétrons que podem ser compartilhados com o metal (RAMOS, 2011).

O íon metálico é denominado ácido de Lewis (espécie receptora de pares de elétrons) e os ligantes são as bases de Lewis (espécies doadoras de elétrons). O complexo metálico pode ser neutro, carregado positivamente, ou carregado negativamente; os complexos metálicos eletricamente carregados são às vezes chamados de íons complexos. Um composto de coordenação contém um ou mais complexos metálicos (RAMOS, 2011; CHEMISTRY LIBRETEXTS, 2018).

Inicialmente o estudo dos compostos de coordenação buscou compreender e encontrar novas geometrias, estados de oxidação, cores e números de coordenação dos metais, entretanto com o avanço da tecnologia o comportamento dos complexos começou a ser elucidado e as buscas foram redirecionadas para a compreensão das propriedades magnéticas, biológicas e aplicações na medicina (RAMOS, 2011).

Apesar da utilização dos metais desde a antiguidade, o uso de complexos metálicos estruturalmente definidos ocorreu somente por volta do século XX com a descoberta do Salvarsan[®] que teve a estrutura elucidada somente em 2005. Desde então, diversos complexos começaram a ser sintetizados e aplicados na medicina (GASSER; PRIZE, 2015).

A era dos complexos metálicos na medicina foi de fato anunciada com a descoberta da cisplatina e seu sucesso clínico contra vários tipos de câncer, como câncer de ovário, cabeça e pescoço, pulmão, testículo e bexiga. Com o intuito de melhorar os perfis farmacológicos de complexos metálicos e descobrir novas propriedades medicinais, os cientistas estão se interessando cada vez mais pelo desenvolvimento de compostos de metal não platinado, como rutênio, titânio, índio, gálio, ouro, prata, cobre, entre outros (VAROL, 2016).

Existem vários exemplos de medicamentos à base de metal que ainda estão atualmente em uso e esses compostos ilustram tanto o potencial dessa classe de compostos como a necessidade de um trabalho adicional para aperfeiçoar seu uso em um ambiente clínico (MJOS; ORVIG, 2014).

Os complexos metálicos oferecem propriedades extraordinárias para a produção de produtos farmacêuticos que podem vir a ser utilizados em DTNs, visto que esses complexos possuem propriedades únicas como a fácil síntese em larga escala, além de apresentarem características como capacidade em contornar os mecanismos de resistência e a possibilidade de utilizar a abordagem de design de moléculas multi-alvo, ou seja, síntese de compostos que podem atingir o organismo alvo por pelo menos dois mecanismos independentes. Um exemplo proeminente é auranofin, um dos medicamentos mais antigos que estão sendo reaproveitados por mais de uma doença, incluindo artrite reumatóide, leishmaniose e esquistossomose (ONG *et al.*, 2019).

Atualmente, sabe-se que a união dos ligantes (agentes quelantes) com um íon metálico formam o complexo metálico (quelato) e esse processo de quelação permite melhor direcionamento e proteção contra possíveis reações colaterais, tornando o complexo mais ativo e menos tóxico que o metal de forma isolada. Os ligantes desempenham um papel crucial na eficácia dos complexos metálicos, visto que são responsáveis pela modulação das

propriedades rígidas e flexíveis do metal e o equilíbrio lipofílico e hidrofílico, modificando a solubilidade, bem como a capacidade de atravessar a membrana celular, além disso, a natureza do ligante determina a estabilidade do complexo em relação à transquelação com moléculas biológicas e tem como função transportar o metal para o alvo de maneira estável (MAFFEI *et al.*, 2009; GANDIN *et al.*, 2014).

Devido à versatilidade dos metais de coordenação e a possibilidade de utilizar diferentes ligantes em busca de menor toxicidade, maior atividade biológica, especificidade melhorada, melhor estabilidade ou uma meia vida melhorada *in vivo*, estes têm sido uma nova estratégia para encontrar novas drogas leishmanicidas (TAHGHIGHI, 2014).

2.11.2 Nanopartículas metálicas

A nanomedicina envolve o desenvolvimento e aplicação de materiais e tecnologias em escala nanométrica que sejam recicláveis, sustentáveis, confiáveis e baratas, desta forma, destaca-se por ser um campo interdisciplinar, onde a nanociência, nanoengenharia e nanotecnologia interagem com a finalidade de contribuir na área da saúde (SANCHEZ *et al.*, 2011; BOISSEAU; LOUBATON, 2011; SILVA, 2016).

A nanotecnologia abre um vasto campo de pesquisa e aplicação devido à capacidade de desenvolver moléculas biológicas em nanoescala, podendo ter aplicabilidade no diagnóstico, tratamento e medicina regenerativa (PELAZ, 2016).

A busca pelo desenvolvimento de medicamentos em nanoescala tem ganho espaço, e estes medicamentos são denominados de nanofármacos (*Nanodrugs*). As nanopartículas (NPs) são os componentes-chave, sendo idealizadas para o sistema de entrega direcionada do medicamento em um sítio alvo, visando o direcionamento do princípio ativo, aumentando a eficácia do fármaco e diminuindo a toxicidade para o organismo (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; SILVA, 2016).

A composição, estrutura e características de superfície das NPs podem variar e estas podem possuir um tamanho de 1 - 100 nm. Existem diversos tipos de nanopartículas como lipossomas, micelas, dendrímeros, nanoesferas, nanocápsulas, entre outras. Devido a essas características essas partículas podem realizar a entrega do princípio ativo em locais de difícil acesso no organismo (FARAJI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2012; SILVA, 2016).

É necessário ressaltar que o sistema fagocitário mononuclear possui a tendência de eliminar essas NPs, desta forma, é necessário que a propriedade da superfície seja planejada

durante o desenvolvimento em busca de atingir alvos específicos, podendo ocorrer à incorporação de proteínas, anticorpos, glicoproteínas e polissacarídeos na superfície dessas NPs (HE *et al.*, 2010; BISWARO, 2016).

Os macrófagos, células alvo das espécies de *Leishmania*, são conhecidos por apresentarem uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões em sua superfície, sendo assim, há a possibilidade do desenvolvimento de NPs que sejam planejadas para obter o reconhecimento dos receptores presentes na superfície dos macrófagos (GUPTA *et al.*, 2009; SILVA, 2016). As NPs de metal estão despertando interesse devido à atividade antibacteriana, mas diversos estudos têm apresentado atividade significativa de NPs metálicas contra vírus, fungos e parasitas (DELLA PEPA *et al.*, 2017).

2.11.3 Metais de transição na biomedicina

Os metais de transição apresentam características peculiares que favorecem o desempenho em funções biológicas, sendo elas: a) mais de um estado de valência relativamente estável; b) íons de metais de transição, formam complexos fortes com ânions ou com a extremidade negativa de moléculas dipolares, e particularmente em suas valências mais baixas, podem se ligar a O₂, que é uma molécula neutra e simétrica; c) podem apresentar uma surpreendente multifuncionalidade biológica devido a versatilidade nos possíveis ligantes e pelo arranjo espacial dos mesmos (MALKIN; MALMSTROM, 1970).

Na busca e desenvolvimento de novos fármacos os metais de transição surgem como uma alternativa atraente devido ao seu amplo espectro de ação, podendo atuar em diversos compartimentos e organelas dos protozoários, além da baixa toxicidade em hospedeiros mamíferos (VELÁSQUEZ *et al.*, 2017). Diante dessas vantagens diversos estudos tem sido desenvolvido com diferentes metais de transição como cobre, paládio, bismuto e tântalo na busca por atividade leishmanicida (CHAGAS, 2015; KHAN *et al.*, 2018, PATHAK *et al.*, 2017; DOMINGOS, 2018).

2.11.3.1 Cobre

O cobre (Cu) é um metal de transição com número atômico 29 e massa molecular 63,546 g/mol, com três estados de oxidação acessíveis: Cu⁰, Cu⁺ e o Cu²⁺, sendo os dois últimos encontrados nos sistemas biológicos (SABINO, 2014). É um micronutriente essencial

aos organismos que vivem em ambientes ricos em oxigênio, sendo assim, um elemento biologicamente ativo, exercendo diversas funções biológicas como desenvolvimento embrionário, respiração mitocondrial, regulação dos níveis de hemoglobina, respiração celular, metabolismo do ferro, biossíntese de neurotransmissores, desintoxicação por radicais livres, entre outros (KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008).

Esse metal em geral está associado a proteínas específicas e as funções desenvolvidas se enquadram em três categorias principais: participação em reações de transferência de elétrons, transporte de oxigênio e transporte ou armazenamento do próprio metal (MALKIN; MALMSTROM, 1970).

A sua ingestão pode ser realizada através do consumo de plantas e a maior concentração de Cu é encontrada no leite materno humano (0,25 a 6,0 mg/L). A absorção desse metal ocorre no estômago e trato intestinal superior, tendo a maior deposição em hepatócitos (KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008).

O transporte e a utilização do cobre envolvem uma interação complexa entre transportadores e proteínas/acompanhantes de ligação pois o cobre intracelular precisa ser mantido em um estado complexo e as concentrações de cobre intracelular devem ser extremamente reguladas para evitar o dano oxidativo, visto que íons de cobre livre são extremamente tóxicos e podem causar danos ao ADN, proteínas e componentes da membrana. A presença em excesso ou total ausência de cobre está relacionada a doenças como doença de Wilson e doença de Menkes (TISATO, 2010; KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008; GANDIN *et al.*, 2014).

Além das funções biológicas o cobre complexado pode desempenhar funções terapêuticas; estudos como de Gandin *et al.* (2014) e Porchia *et al.* (2020) têm sido realizados sob a inspiração dos derivados de Cu⁺, apresentando resultados em que complexos de cobre(I) são capazes de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, estudos estão utilizando complexos de cobre em diferentes estados de oxidação contra formas promastigotas e amastigotas, os estudos de Arndt *et al.* (2017), Portas *et al.* (2011) e Maffei *et al.* (2009) apresentam a síntese de complexos de Cu(II) e demonstram a atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Outros estudos foram realizados com diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de LT e leishmaniose visceral, podendo ser citado o estudo de Singh *et al.* (2017) que testou salicilaldoxima de cobre (CuSAL) contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani*; Saeed *et al.* (2018) testaram complexos de Cu(I) contra formas promastigotas de *L. tropica* e

Mendéz-Arriaga *et al.* (2018) utilizou complexos de cobre(II) contra formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. donovani*.

2.11.3.2 Paládio

O paládio (Pd) é um metal de transição com número atômico 46 e massa molecular 106,42 g/mol. Apesar de possuir diversos estados de oxidação acessíveis, os principais são II e IV, sendo o Pd(II) o estado de oxidação mais estável e que pode ser encontrado na forma de óxidos, haletos, nitratos e sulfatos (GOIS, 2018).

Atualmente, sabe-se que os compostos de coordenação de Pd(II) apresentam diversas aplicações devido a extensa variedade de ligantes que coordena, entretanto nas últimas décadas, o estudo desses complexos foram concentrados no campo das atividades antiproliferativas e da catalanálise. Novos estudos com esse elemento estão sendo desenvolvidos visando identificar fragmentos farmacofóricos para projetar novos metalofármacos anticâncer bioativos para terapias mais baratas e seguras (KHAN *et al.*, 2018).

Os complexos de paládio destacam-se atualmente devido a atividade antitumoral comparável ou superior a cisplatina, visto que apresentam similaridades estruturais com os de platina, além de apresentar melhor solubilidade e menor toxicidade, tendo como propriedade a interação com ADN e ARN (ácido ribonucleico) (PASSALACQUA, 2018; GOIS, 2018); além de atividades antimicobacteriana e antiprotozoária (SOUZA, 2017).

Diversos estudos têm apresentado resultados da atividade de complexos de Pd contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp., podendo ser citado o estudo realizado por Khan *et al.* (2018) em que complexos de Pd(II) foram testados contra formas promastigotas de *L. tropica* e Cunha *et al.* (2020) e Velásquez *et al.* (2017) que testaram complexos de Pd(II) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

2.11.3.3 Tântalo

O tântalo é um metal de transição, com número atômico 73 e massa molar 180,9479 g/mol, sendo este muito utilizado na indústria para a produção de componentes eletrônicos e equipamentos que necessitam de alta resistência mecânica ou química (KIM *et al.*, 2016), este

metal tem recebido destaque visto que o Brasil é detentor de 98% das reservas comercialmente viáveis, sendo o segundo maior produtor de Ta (USGS, 2017).

Quanto a aplicação biomédica o Ta tem sido relatado como um dos principais componentes em implantes e próteses, visto a sua resistência e baixa capacidade de rejeição (CHELLAN; SADLER, 2015), outros relatos incluem aplicabilidade como possível antitumoral e antiparasitário (CABALLERO; SALAS; SÁNCHEZ-MORENO, 2014; DOMINGOS, 2018). Além disso, sabe-se que o tântalo está presente em quantidades mensuráveis no organismo humano, cerca de 0,2 mg, entretanto sem função biológica definida (GREENWOOD, 2003).

Apesar do pouco conhecimento a respeito da aplicação biomédica, bem como o conhecimento da função biológica, esse metal destaca-se, pois, apresenta características semelhantes ao antimônio (Sb), como baixa toxicidade e possibilidade de produção de óxidos, além de ser atrativo comercialmente (KIM *et al.*, 2016).

O estudo de Domingos (2018) é o único relato do uso de nanopartículas de tântalo para o tratamento experimental da leishmaniose cutânea, demonstrando que houve eficácia *in vitro* contra as espécies *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, não apresentando citotoxicidade em modelos *in vitro*, porém em ensaios experimentais *in vivo* com infecção de *Mesocricetus auratus* por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, houve o agravamento na evolução das lesões cutâneas.

2.11.3.4 Bismuto

O bismuto (Bi) é considerado um metal (ou semi-metal), localizado no grupo 15 da classificação periódica, com número atômico 83 e massa molar 208,9, com dois estados de oxidação predominantes, sendo eles o trivalente e o pentavalente. Biologicamente sabe-se que este metal está associado a interações com nucleosídeos/nucleotídeos; aminoácidos/peptídeos e proteínas/enzimas, dessa forma esse metal desperta interesse no estudo para identificação de possíveis alvos de medicamentos à base de Bi (SUN *et al.*, 2011; KEOGAN; GRIFFITH, 2014), além disso outro fator notável é a baixa toxicidade desse metal (KANATZIDIS; SUN; DEHNEN, 2020).

Na medicina os efeitos adstringentes, anti-sépticos e diuréticos de compostos de Bi são conhecidos e aplicados desde os tempos alquimistas, e embora tenha sido utilizado amplamente para o tratamento de sífilis, a demanda desses medicamentos diminuiu

drasticamente após o surgimento dos antibióticos. A retomada da utilização de composto de Bi ocorreu após a descoberta deste elemento como um princípio ativo promissor para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, alguns medicamentos mais famosos são o Pepto-Bismol (subsalicilato de bismuto) e De-Nol (subcitrato de bismuto coloidal) (KEOGAN; GRIFFITH, 2014).

Recentemente, pesquisas com Bi buscam desenvolver novos agentes de contraste de imagem, compostos bioativos de bismuto como fármacos antiinflamatórios, metalodrogas com atividade antimicrobiana, antitumoral e antileishmania (KANATZIDIS; SUN; DEHNEN, 2020).

Estudos recentes foram realizados com complexos de Bi(III) e Bi(V) avaliando atividade antileishmania; Andleeb *et al.* (2019) avaliou a atividade de sete complexos de Bi(V) contra formas promastigotas de *Leishmania tropica* (kwh23) e no estudo realizado por Pathak *et al.* (2017) dois complexos de Bi(III) obtiveram resultados promissores em promastigotas de *Leishmania major*.

2.12 Vias alternativas de tratamento na Leishmaniose Tegumentar

Há cerca de 40 anos atrás o termo “farmacocinética” foi introduzido para denominar o estudo da absorção, distribuição, biotransformação e excreção do fármaco no decurso do tempo. Sendo a absorção o primeiro dos passos cinéticos e para que esta ocorra a droga precisa ser introduzida ou administrada no organismo (SCHELLACK, 2005).

As drogas podem ser administradas sistemicamente ou aplicadas por via tópica; as vias sistêmicas são utilizadas quando há necessidade de absorção pela circulação sanguínea para que a droga seja efetiva, em quanto que na via tópica a absorção ocorre em uma área específica da superfície corporal onde exercerão um efeito localizado. As vias mais utilizadas no tratamento da leishmaniose são intramusculares, endovenosa e intralesional (SCHELLACK, 2005; BRASIL, 2017).

Apesar das vantagens da administração dos medicamentos por via sistêmica, o DNDi (2018b) considera o tratamento da leishmaniose como de difícil administração, além de se tornarem muitas vezes de longa duração e/ou necessitem de hospitalização, o que consequentemente acarreta na desistência do tratamento.

Frente às dificuldades encontradas no tratamento da leishmaniose, há a necessidade da busca por tratamentos alternativos, especialmente visando o desenvolvimento de formulações

para o tratamento tópico e oral que possam ser mais eficazes e com efeitos adversos menores. Neste contexto, o tratamento tópico torna-se uma abordagem atraente para formas clínicas simples de LC que não exijam terapia sistêmica, além disso formulações tópicas podem oferecer vantagens significativas como facilidade de administração, menores efeitos adversos e relação custo-benefício (NASSIF *et al.*, 2017).

Entretanto, para a utilização dessas formulações tópicas deve-se levar em consideração vários fatores como a preparação da formulação (solubilidade, propriedades físico-químicas, pH, viscosidade) e as várias barreiras na pele (condições da pele, hidratação, microflora, pH, temperatura, metabolismo, efeitos dos solventes, agentes bioquímicos, transpiração) considerando que a mesma é constituída de diversas camadas, sendo elas: camada córnea, epiderme, derme, hipoderme e os apêndices (folículos capilares, glândulas sebáceas, glândulas écrinas e glândulas apócrinas) (GARNIER; CROFT, 2002).

Outra consideração importante refere-se às diferentes manifestações clínicas que a LT apresenta, visto que as condições da pele podem apresentar característica de favorecimento a formulações tópicas como a presença de lesões abertas em que há perda das propriedades de barreira da camada córnea ou a presença de espessamento epitelial e formação de escara que pode apresentar um impedimento adicional à absorção (GARNIER; CROFT, 2002; NASSIF *et al.*, 2017).

Dessa forma, o desenvolvimento de formulações tópicas deve considerar propriedades físico-químicas e o efeito na liberação percutânea de absorção e retenção de drogas nos locais de infecção na derme, sempre ressaltando que a eficácia terapêutica irá depender da permeação adequada e da potência farmacológica (GARNIER; CROFT, 2002; NASSIF *et al.*, 2017).

2.12.1 Pomadas

As pomadas são preparações semissólidas, de consistência mole, destinadas ao uso na pele e/ou mucosas, sendo utilizadas como lubrificantes ou hidratantes, ou para aplicação de substâncias ativas na pele, com fim protetor, terapêutico ou profilático, quando se deseja promover um efeito oclusivo. Quando aplicadas sobre a pele devem amolecer ou fundir-se com a temperatura corporal, necessitando em algumas circunstâncias de pequenos esforços mecânicos na aplicação. Comumente as pomadas apresentam atividade terapêutica mais efetiva quando comparado aos cremes, entretanto, há uma predileção dos pacientes ao uso de cremes (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018; PATRÍCIO, 2018).

As pomadas podem ser obtidas a partir da incorporação (não necessita de aquecimento) ou fusão (necessita de aquecimento). As preparações a temperatura ambiente (TA), apenas utilizando método de mistura sem aquecimento são indicadas como de melhor conduta visto que possuem a capacidade de melhor preservação do princípio ativo e melhores características quanto à espalhabilidade (PATRÍCIO, 2018).

As pomadas podem ter características hidrofóbicas ou hidrofílicas; usualmente as pomadas hidrofóbicas possuem efeito emoliente, são de difícil remoção, não “secam” ou alteram visivelmente com o tempo, além disso, servem para manter o fármaco em contato prolongado com a pele e agem como curativos oclusivos. São em geral constituídas de anidras e absorvem apenas pequenas quantidades de água, utilizando como bases para sua formulação hidrocarbonetos insolúveis em água, como parafinas, óleos vegetais, gorduras animais, ceras, entre outras (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018).

As pomadas tipicamente hidrofílicas são miscíveis e removíveis com água, de base gordurosa (hidrofóbica) na qual um agente emulsificante A/O (gordura de lanolina, álcool de lanolina, éster de sorbitano, monoglicerídeo ou álcool graxo) é incorporado para torná-las hidrofílicas (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018).

A escolha da base para a formulação deve considerar diversos fatores, como a natureza do fármaco, a ação desejada, a biodisponibilidade, as condições clínicas do local em que será aplicado e estabilidade física e química (OTTO, FRANÇA, HOEFLER, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma avaliação pré-clínica de complexos (cobre e paládio) e nanopartículas (tântalo e bismuto) metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

- Avaliar o efeito *in vitro* do complexo de cobre(I) em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* do complexo de cobre(I) em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos;
- Investigar a eficácia *in vivo* do complexo de cobre(I) no tratamento experimental de leishmaniose cutânea em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *Leishmania* spp.

Capítulo 2

- Sintetizar complexos de paládio(II);
- Avaliar o efeito *in vitro* dos complexos de paládio em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos complexos de paládio em macrófagos peritoneais murinos.

Capítulo 3

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de tântalo;
- Avaliar o efeito *in vitro* de nanopartículas de tântalo em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas de tântalo em macrófagos peritoneais murinos;
- Investigar a eficácia *in vivo* das nanopartículas de tântalo no tratamento experimental de leishmaniose cutânea em camundongos (*Mus musculus*) infectados por *Leishmania* spp.

Capítulo 4

- Avaliar o efeito *in vitro* de nanopartículas de bismuto em formas evolutivas de *Leishmania* spp.;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de bismuto em macrófagos peritoneais murinos.

4 METODOLOGIA

Essa pesquisa foi desenvolvida por meio da colaboração dos laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco Pereira;
- Laboratório Temático Biotério Central do INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, coordenado pelo MSc. Leonardo Brandão Matos;
- Istituto di Chimica della Materia Condensata e di Tecnologie per l'Energetica, Conselho Nacional de Pesquisas da Itália, CNR, Pádua, Itália, colaboração com Dr. Francesco Tisato e Dra. Marina Porchia;
- Departamento de Química, Universidade de Helsinque - Helsinque, Finlândia, colaboração com Dr. Andriy Grafov.
- Instituto de Química Geral e Inorgânica V. I. Vernadskii, Kyiv, Ucrânia, colaboração com Dr. Pehnyo.

4.1 Síntese das substâncias

4.1.1 Síntese do complexo de cobre(I)

A síntese do complexo $[\text{HB}(\text{pz})_3]\text{Cu}(\text{PCN})$ está descrita no estudo de Gandin *et al.* (2014) e para os testes biológicos realizados neste estudo, o complexo foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO - Vetec[®], EUA, 2% v/v) e em solução salina tamponada, filtrado por uma membrana com poros de 0,22 μm , sob condições estéreis.

4.1.2 Síntese dos complexos de paládio

Preparação de solução $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$

Utilizando uma balança analítica (AY220, Marte, Shimadzu, Brasil) e um béquer (50 mL) foi pesado 1,082 g (6,1 mmol) do PdCl_2 (CAS: 7647-10-1, Merck, ReagentPlus[®]),

posteriormente foi adicionado 4 mL de cloreto de sódio (0,9%), 21 mL de água destilada e aproximadamente 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (CAS: 7647-01-0, Merck).

Para a total dissolução do PdCl₂, a mistura foi levada ao agitador em banho maria a 40 °C. Após a dissolução a substância foi colocada em uma placa petri de vidro deixada sob fluxo de ar a temperatura ambiente para total evaporação, tornando-se um composto seco de coloração marrom (Na₂[PdCl₄]). Posteriormente, 55,31 mg do Na₂[PdCl₄] foi diluído em 10 mL de cloreto de sódio (0,9%) (ADV FARMA) e reservado em frasco de vidro.

Preparação de soluções-estoque dos ligantes

Ácido etidrônico, ácido monohidratado (1-Hidroxi-etilideno) bisfosfônico monohidrato

Utilizando uma balança analítica e um béquer foi pesado 21,06 mg do ácido etidrônico (AE), em seguida foi adicionado 4 mL de cloreto de sódio (0,9%), após uma leve agitação com bastão de vidro, foi adicionado aproximadamente 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH, 1,0 M, CAS: 1310-73-2, Merck) para ajustar o pH até 7,0, em seguida foi ajustado para o volume final até 5 mL com cloreto de sódio (0,9%), filtrado em membrana de 0,22 µm e reservado em frasco de vidro.

Prodonato de sódio, monohidrato (sal monossódico do ácido 2-pirolidinil-1-hidroxi-metano-1,1-bisfosfônico)

Utilizando uma balança analítica e um béquer foi pesado 28,30 mg do sódio protonato (PS), em seguida foi adicionado 4,5 mL de cloreto de sódio (0,9%), após uma leve agitação com bastão de vidro, foi ajustado para o volume final até 5 mL com cloreto de sódio (0,9%), filtrado em membrana de 0,22 µm e reservado em frasco de vidro.

Ibandronato de sódio, monohidrato (sal monossódico do ácido 1-hidroxi-3-(metilpentilamino)propilideno)bisfosfônico)

Utilizando uma balança analítica e um béquer foi pesado 33,77 mg do sódio ibandronato (IS), em seguida foi adicionado 4,5 mL de cloreto de sódio (0,9%), após uma leve

agitação com bastão de vidro, foi ajustado para o volume final até 5 mL com cloreto de sódio (0,9%), filtrado em membrana de 0,22 μm e reservado em frasco de vidro.

Preparação de complexos do paládio

Para a preparação dos complexos de paládio em três béqueres diferentes foi adicionado 2,5 mL da solução-estoque do $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$ e posteriormente em cada béquer foi adicionado 2,5 mL de uma das solução-estoque de ligante. Posteriormente esses béqueres foram deixados por 24 horas sob agitação moderada a TA, em seguida foram filtrados (membrana 0,22 μm) e reservados em frascos de vidro para serem posteriormente utilizados nos ensaios biológicos.

4.1.3 Síntese das nanopartículas de tântalo (NPsTa)

Em um béquer foram adicionados 7 mL de ácido clorídrico (CAS: 7647-01-0, Merck) e 1,6 mL de etóxido de tântalo(V) (CAS: 6074-84-6, Strem Chemicals) a uma temperatura ≤ 50 °C, em agitação constante. Após a homogeneização, foram adicionados polietilenoglicol (7 mL), água (84,4 mL) e N-metil-glucosamina (proporção 1:10 Ta/NMGA), então a solução foi dialisada por uma hora usando tubo de membrana de celulose (Sigma-Aldrich Co., produto n° D9777) e por fim a solução foi armazenada em frascos de vidro. A caracterização do tamanho de partícula e do potencial zeta das NPsTa foi realizada por Difusão Dinâmica de Luz (DDL) no Zetasizer Nano (Malvern Instruments) em cubetas de poliestireno apropriadas.

4.1.4 Síntese das nanopartículas de bismuto (NPsBi)

As nanopartículas foram sintetizadas e cedidas pelo Prof. Dr. Andriy Grafov, devido a solicitação de sigilo do mesmo, a síntese das NPsBi não será apresentado nesse manuscrito.

A caracterização do tamanho de partícula e do potencial zeta das NPsBi foi realizada por Difusão Dinâmica de Luz (DDL) no Zetasizer Nano (Malvern Instruments) em cubetas de poliestireno apropriadas.

4.2 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA/INPA: 023/2020 - 01280.000455/2020-41) e CEUA/INPA: 059/2018 - 01280.001884/2018-11) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CAAE: 29406319.2.0000.5020).

4.3 Estudo pré-clínico *in vitro*

4.3.1 Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária

As cepas utilizadas nesse estudo foram *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2904) e *Leishmania (Viannia) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), criopreservadas no criobanco de cepas do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/COSAS/INPA.

Para o cultivo e obtenção de massa parasitária das formas promastigotas foi utilizado o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brazil), incubadas a 25 °C. Após amplificação dos parasitas em garrafas de cultivo as amostras foram centrifugadas na centrífuga 5702 (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) a 4.400 rpm/15 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo e direcionado para a utilização em ensaios biológicos.

4.3.2 Curva de Crescimento

Para avaliar o crescimento das formas promastigotas a massa parasitária obtida anteriormente foi centrifugada a 4.400 rpm/15 minutos, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo, foi retirado uma alíquota de 10 µL e feito uma quantificação de promastigotas em câmara de Neubauer para a obtenção da concentração de 10^6 promastigotas/mL. Em seguida, 500 µL contendo formas promastigotas (10^6 promastigotas/mL) foi adicionado em tubos eppendorf (triplicata) contendo 100 µL de meio RPMI completo e incubadas a 25 °C. A cada 24 horas foi realizada a quantificação de

parasitas viáveis em 10 µL, utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon, Japão) em aumento de 400X.

O cálculo foi feito utilizando a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ total de parasitas/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ total de parasitas}}{N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

A quantificação de promastigotas viáveis foi realizada até a observação do período de declínio no crescimento e/ou morte dos parasitas (CUNHA, 2017).

4.3.3 Esquema de ensaios biológicos

Foram realizadas *in vitro* avaliações da atividade antileishmania e citotoxicidade. As substâncias que se apresentaram promissoras nos ensaios *in vitro* foram selecionadas para os ensaios *in vivo* (Tabela 5).

Tabela 5 – Esquema de ensaios biológicos realizados com as diferentes substâncias.

Substâncias	Tipo de estudo			
	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>	
	<i>Leishmania spp.</i>	Modelo celular	<i>Leishmania spp.</i>	Modelo animal experimental
Complexo de cobre(I)	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) naiffi</i>	MPM e MH	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>
Complexos de paládio(II)	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>	MPM		NR
NPsTa	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MPM	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Mus musculus</i>
NPsBi	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>	MPM		NR

NR = não realizado; MPM = macrófagos peritoneais murinos; MH = monócitos humanos.

4.3.4 Ensaio biológico com formas promastigota

No ensaio com formas promastigotas as substâncias e concentrações testadas foram complexo de cobre(I) (0,16 a 0,01 mM), complexos de Pd(II) (0,06 a 0,0038 mM), NPs_{Ta} (0,003 a 0,00015 mM) e NPs_{Bi} (0,00087 a 0,00005 mM) e Glucantime[®] (33 a 2,06 mM ou 0,003 a 0,00015 mM ou 0,00087 a 0,00005 mM), por meio de diluição seriada (1/2).

Para a realização do ensaio foi adicionado inicialmente 100 µL de meio RPMI completo e em placas de 96 poços, em seguida de forma individual no primeiro poço foi adicionado 100 µL das substâncias (3 poços por substância) em teste com posterior diluição seriada até a obtenção de cinco diluições (concentrações determinadas anteriormente) e por fim foram adicionados 100 µL de meio RPMI completo contendo formas promastigotas e como controle negativo foram adicionados poços com formas promastigotas sem tratamento.

As placas foram incubadas em estufa a 24 °C e a atividade biológica foi determinada pela inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* spp., por meio de quantificação de promastigotas viáveis em um hemocitômetro, usando um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com ampliação de 400x, com o corante Azul de Tripan (Trypan Blue 0.5% - euroclone, Pero, MI, ITA), durante 24, 48 e 72 horas (CHAGAS *et al.*, 2021). Os dados foram expressos em concentração inibitória média (CI₅₀).

4.3.5 Ensaio biológico de citotoxicidade

Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Para a obtenção de macrófagos peritoneais murinos camundongos BALB/c foram eutanasiados e posteriormente foi realizada incisão superficial na região do peritônio, seguido da introdução de 5 mL de meio RPMI com posterior massagem nesta região. O meio foi aspirado com a seringa e transferido para tubos falcon que foram levados a centrifuga a 4.400 rpm/15 minutos, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo e por fim os macrófagos foram quantificados e encaminhados para os ensaios biológicos (DOMINGOS, 2018).

Obtenção de monócitos humanos

Para obtenção dos monócitos humanos foi realizado a coleta de 3 mL de sangue de um doador sadio, em seguida esse sangue foi homogeneizado com 5 mL de meio RPMI. Essa solução foi adicionada a um tubo falcon de 15 mL contendo 3 mL de Histopaque[®]- 1077 (Sigma Aldrich[™], Reino Unido). O tubo foi levado a centrífuga Excelsa 2 (FANEM LTDA, Brasil), na velocidade 5, por 30 minutos. Após a centrifugação foi realizado a remoção da camada mononuclear e transferida para um tubo falcon de 15 mL, com adição de PSB 1x (pH 7,4) em um volume referente a três vezes ao volume obtido da camada mononuclear. Em seguida foi realizado a centrifugação em 5.500 rpm/10 minutos, 4 °C, na centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA), esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes, por fim o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo. Os monócitos obtidos foram quantificados e encaminhados para os ensaios biológicos (ALBUQUERQUE, 2006).

Ensaio de citotoxicidade

No ensaio de citotoxicidade as substâncias e concentrações em testadas foram complexo de cobre(I) (0,16 a 0,01 mM), complexos de Pd(II) (0,06 a 0,0038 mM), NPsTa (0,003 a 0,00015 mM) e NPsBi (0,00087 a 0,00005 mM) e Glucantime[®] (33 a 2,06 mM ou 0,003 a 0,00015 mM ou 0,00087 a 0,00005 mM), por meio de diluição seriada (1/2).

Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI Medium 1640 (1X) sem vermelho de fenol (Gibco[®], IGC Biotecnologia, Brasil) acrescido de 10% de SFBi, em seguida de forma individual no primeiro poço foi adicionado 100 µL das substâncias (3 poços por substância) em teste com posterior diluição seriada até a obtenção de cinco diluições (concentrações determinadas anteriormente) e por fim foi adicionado 100 µL de meio RPMI completo contendo os macrófagos peritoneais murinos ou monócitos humanos (2×10^5 células/mL) obtidos anteriormente (os ensaios foram feitos de forma individual para os diferentes modelos de células). Como controle foram adotados poços sem células e células sem tratamento. As placas foram acondicionadas em incubadora Forma Series II Water Jacket CO₂ Incubator (Thermo Scientific, USA) a 37 °C com 5% de CO₂ por um período de 24, 48 e 72 horas. A cada 24 horas uma placa foi retirada para a adição de 10 µL de Alamar Blue[®], a placa foi novamente incubada por 12 horas e em seguida levada para leitura no espectrofotômetro Elx800[™] (BIO-TEK[®], Winooski, Vermont, USA) em um comprimento de

onda de 590 nm (DOMINGOS, 2018). Os dados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular.

4.3.6 Ensaio biológico com formas amastigotas

No ensaio com formas amastigotas as substâncias e concentrações em teste foram complexo de cobre(I) (0,16 a 0,02 mM), complexos de paládio (0,06 a 0,0075 mM), NPsTa (0,0 a 0,00038 mM) e NPsBi (0,00087 a 0,00010 mM) e Glucantime[®] (33 a 4,12 mM ou 0,003 a 0,00037 mM ou 0,00010 mM), por meio de diluição seriada (1/2).

Em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e meio RPMI completo foi adicionado 100 µL de macrófagos peritoneais murinos ou monócitos humanos (2×10^5 células/mL) obtidos previamente, com posterior incubação em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas de adesão celular, os macrófagos peritoneais murinos ou monócitos humanos foram infectados com solução de 100 µL de promastigotas (2×10^6 promastigotas/mL) por um período de 1 hora (monócitos humanos) ou 2 horas (macrófagos peritoneais murinos). Em seguida de forma individual no primeiro poço foi adicionado 100 µL das substâncias (3 poços por substância) em teste com posterior diluição seriada até a obtenção de quatro diluições (concentrações determinadas anteriormente) e como controle foram adotados poços com células infectadas e sem tratamento. As placas foram incubadas novamente por 24, 48 e 72 horas, a cada 24 horas placas eram removidas e os materiais biológicos fixados e corados pelo método Panótico Rápido (Laborclin[®], Paraná, Brasil). A análise foi realizada pela quantificação de 100 células para determinar a taxa de infecção considerando células infectadas e não infectadas. A quantificação foi realizada usando um microscópio óptico com aumento de 1000x (DOMINGOS, 2018).

4.4 Estudo pré-clínico *in vivo* com complexo de cobre(I)

4.4.1 Formulação tópica com complexo de cobre(I)

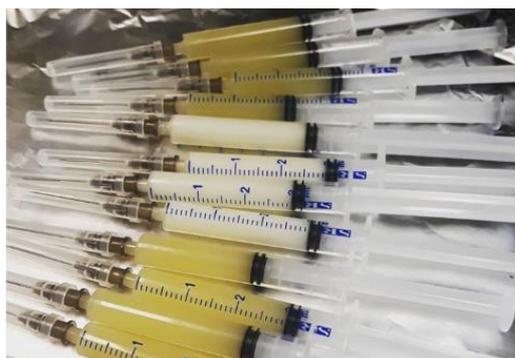
A pomada base hidrofóbica contendo o complexo de cobre(I) foi preparado conforme adaptação da metodologia descrita por Patrício (2018). Os componentes da formulação encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 6 – Composição da pomada.

Componentes	Quantidade
Propilenoglicol q.s.	5 mL
Lanolina anidra 30%	9 g
BHT 0,02%	0,006 g
Vaselina sólida q.s.p. 30%	21 g
Solução de [Cu(PCN)(HBPz ₃)] em DMSO (0,22 g)	0,5 – 1 g

Para o preparo da pomada base inicialmente todos os componentes foram pesados em balança analítica (AY220, Marte, Shimadzu, Brasil) e em seguida em um grau foi feita a dispersão do BHT em q.s. de propilenoglicol, posteriormente por meio de homogeneização manual a lanolina anidra e a vaselina sólida foram incorporadas à solução de BHT e propilenoglicol. Por fim a solução de [HB(pz)₃]Cu(PCN) foi incorporada a pomada base (PATRÍCIO, 2018). A formulação foi preparada em triplicata e acondicionada em potes de vidro, com tampa de vidro rosqueável e armazenados ao abrigo da luz. Para a realização do tratamento dos animais, a pomada foi diariamente acondicionada em seringas de 3 mL para administração nos animais de experimentação (Figura 14).

Figura 14. Pomadas envasadas em seringas para administração em animais de experimentação com lesões leishmanióticas.



Fonte: Próprio autor (2021).

A caracterização da pomada foi feita por meio dos parâmetro cor, odor, consistência, sedimentação e pH foram realizado conforme a ANVISA (2004) e os testes da formulação da pomada do complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN) foram realizados nos tempos zero (T0) e 30 (T30), utilizando como base a metodologia de Matos (2016), com algumas adaptações, assim, cor e o

brilho foram analisados à luz do dia; a consistência foi avaliada através do toque nas temperaturas - 6 °C, 5 °C, TA, 37 °C e 40 °C; o odor foi classificado em ausente, fraco, distinto ou forte; o pH foi aferido por determinação colorimétrica (Ref 902-03, Macherey-Nagel, Alemanha); a sedimentação foi realizada por meio da centrifugação de tubos Falcons contendo a pomada em rotação de 3000 rpm durante 30 minutos.

4.4.2 Procedência dos animais de experimentação

Foram utilizados hamster (*Mesocricetus auratus*) provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, mantidos em gaiolas em salas condicionadas com fotoperíodo, em condições de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos. Os animais de experimentação eram machos, com idade igual ou maior que oito semanas e peso igual ou maior que 150 g.

4.4.3 Infecção experimental

Após a separação dos grupos de experimentação, utilizando uma seringa estéril os hamsters foram infectados no focinho com inóculo de 0,1 mL de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (10^6 promastigotas/mL), ressaltando que cada animal recebeu o inóculo de apenas uma das espécies testadas (DOMINGOS, 2018).

4.4.4 Delineamento Experimental

Os animais foram separados aleatoriamente em grupos de tratamento, cada grupo continha um total de seis (6) animais. Os grupos consistiram na seguinte divisão:

- **Grupo 1 (NINF):** animais não infectados e não tratados;
- **Grupo 2 (INF):** animais infectados e não tratados;
- **Grupo 3 (Glucantime®):** animais infectados e tratados diariamente com 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia de Glucantime® por via intramuscular (IM);
- **Grupo 4 (Placebo):** animais infectados e tratados diariamente com pomada base (80 mg);

- **Grupo 5 (Cobre):** animais infectados e tratados diariamente com pomada (80 mg) contendo complexo de cobre(I) (0,5 mg).

4.4.5 Tratamento e avaliação do curso clínico da infecção

Os animais foram tratados uma vez por dia, diariamente por um período que variou de 25 a 30 dias. Todos os animais foram submetidos uma (1) vez na semana a aferição do volume total do focinho (altura x largura x comprimento) utilizando paquímetro digital (mtx[®]) e as características clínicas do focinho dos animais também foram fotodocumentadas para a análise da progressão da infecção. Além disso, foi realizado também a pesagem individual dos animais para controle do peso dos mesmos. Os dados numéricos referentes ao volume do focinho e peso dos animais foram tabelados e analisados estatisticamente e apresentados em forma de gráficos e os registros fotográficos foram organizados e apresentados em forma de pranchas para demonstração do curso de infecção durante o tratamento (DOMINGOS, 2018).

4.4.6 Eutanásia

Ao final do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais, conforme legislação para o uso de animais de experimentação e o procedimento foi realizado conforme descrito e aprovado no CEUA 059/2018, por meio dos sedativos Anasedan[®] injetável (Xilasina 2 g) e Dopalen injetável (Ketamina 1,16 g) com apresentação em frasco ampola contendo 10 mL e 50 mL, respectivamente. Após a eutanásia foi realizado a coleta de material biológico para diagnóstico parasitológico e avaliações teciduais.

4.5 Estudo pré-clínico *in vivo* com NPs-Ta

4.5.1 Procedência dos animais de experimentação

Foram utilizados camundongos BALB/c (*Mus Musculus*) provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, mantidos em gaiolas em salas condicionadas com fotoperíodo, em condições de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos. Os animais de experimentação eram machos, com idade igual ou maior que oito semanas e peso igual ou maior que 20 g.

4.5.2 Infecção experimental

Após a separação dos grupos de experimentação, utilizando uma seringa estéril os hamsters foram infectados na pata com inóculo de 0,1 mL de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (10^6 promastigotas/mL) (DOMINGOS, 2018).

4.5.3 Delineamento Experimental

Os animais foram separados aleatoriamente em grupos de tratamento, cada grupo continha um total de seis (6) animais. Os grupos consistiram na seguinte divisão:

- **Grupo 1 (NINF):** animais não infectados e não tratados;
- **Grupo 2 (INF):** animais infectados e não tratados;
- **Grupo 3 (Glucantime[®]):** animais infectados e tratados com 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia de Glucantime[®] por via intramuscular (IM);
- **Grupo 4 (Placebo):** animais infectados e tratados com solução salina;
- **Grupo 5 (NPsTa):** animais infectados e tratados com NPsTa (0,003 mM) por via intralesional (IL).

4.5.4 Tratamento e avaliação do curso clínico da infecção

Os animais foram tratados uma vez por dia, com intervalos de 72 horas, por 15 dias, totalizando 5 aplicações. Todos os animais foram submetidos a aferição do volume total da pata (altura x largura x comprimento) utilizando paquímetro digital (mtx[®]) e as características clínicas da pata dos animais também foram fotodocumentadas para a análise da progressão da infecção. Além disso, foi realizado também a pesagem individual dos animais para controle do peso dos mesmos. Os dados numéricos referentes ao volume da pata e peso dos animais foram tabelados e analisados estatisticamente e apresentados em forma de gráficos e os registros fotográficos foram organizados e apresentados em forma de pranchas para demonstração do curso de infecção durante o tratamento (DOMINGOS, 2018).

4.5.5 Eutanásia

Ao final do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais, conforme legislação para o uso de animais de experimentação e o procedimento foi realizado conforme descrito e aprovado no CEUA 059/2018, por meio dos sedativos Anasedan[®] injetável (Xilasina 2 g) e Dopalen injetável (Ketamina 1,16 g) com apresentação em frasco ampola contendo 10 mL e 50 mL, respectivamente. Após a eutanásia foi realizado a coleta de material biológico para diagnóstico parasitológico e avaliações teciduais.

4.6 Diagnóstico parasitológico

4.6.1 Método direto (impressão por aposição em lâmina - *imprint*)

Pequenos fragmentos de lesão e fígado foram seccionados e com uma pinça estéril foram realizados movimentos de aposição dos fragmentos sobre lâminas previamente limpas; em seguida o material biológico foi fixado e corado na lâmina por meio de Panótico Rápido. O diagnóstico foi realizado por meio de microscopia óptica (aumento 1000x), sendo considerado positivo quando houve identificação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. Além disso, foi realizada a quantificação de formas amastigotas, macrófagos infectados e não infectados em 50 campos por lâmina, para determinar a taxa de infectividade (DOMINGOS, 2018; BRASIL, 2017).

4.6.2 Método de cultivo

Pequenos fragmentos de lesão e fígado foram seccionados e com uma pinça estéril esses fragmentos foram colocados em tubos de NNN (Novy-MacNeal-Nicolle, 1908), sendo estes armazenados por um período de sete (7) dias, após esse período os tubos foram analisados em microscópio óptico (aumento 400x) para determinar a presença ou ausência de formas promastigotas. Os resultados do diagnóstico foram apresentados em positivo ou negativo para o reisolamento de promastigotas de *Leishmania* spp. (DOMINGOS, 2018; BRASIL, 2017).

4.6.3 Análise Estatística

Todos os ensaios biológicos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) e valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas de média entre os diferentes tratamentos (software GraphPad Prism versão 6.0).

Capítulo 1

Atividade *in vitro* e *in vivo* de um complexo hipotóxico de cobre(I) contra espécies dermatópicas de *Leishmania*

Submetido a *Acta Amazonica* em 22/03/2021 e aceito em 19/06/2021

Capítulo 1

Atividade *in vitro* e *in vivo* de um complexo hipotóxico de cobre(I) contra espécies dermatópicas de *Leishmania*

Ana Flávia da Silva Chagas*^{1,2}, Marina Porchia³, Thais Pinto Nascimento², Carolina Nunes Souza Correa², Anny Maíza Vargas Brasil^{1,2}, Maricleide de Farias Naiff², Antonia Maria Ramos Franco².

¹Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³Istituto di Chimica della Materia Condensata e di Tecnologie per l'Energetica, IENI, Pádua, Itália (CNR, National Council of Research, IT CNR – Area della Ricerca di Padova Corso Stati Uniti, 4-35127 Padova, Italy).

*Autor correspondente: chagas.afs@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e, atualmente, o tratamento de primeira escolha é o antimoniato de meglumina. Porém, devido a sua eficácia limitada e alta toxicidade, é necessário buscar novos princípios ativos. Dessa forma, os complexos metálicos, vêm ganhando importância devido à sua eficácia e baixa toxicidade. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* do complexo hipotóxico de cobre(I) [HB(pz)₃]Cu(PCN). Para isso, quatro espécies dermatópicas de *Leishmania* foram testadas com o complexo metálico e sua eficácia foi determinada através da viabilidade parasitária e taxa de infectividade, e a citotoxicidade foi determinada com um corante redox (resazurina). Para os testes *in vivo*, os hamsters foram infectados e as lesões tratadas com uma pomada formulada contendo o complexo; a eficácia do qual foi avaliada medindo o diâmetro do inóculo/localização focinho e determinando a carga parasitária. Os resultados demonstraram toxicidade moderada em macrófagos murinos e monócitos humanos e melhor eficácia na espécie *L. (V.) braziliensis* quando comparada às demais espécies testadas, com redução de 50% na viabilidade das formas promastigotas e amastigotas (*in vitro*). Dados gerais do tratamento tópico diário por até 30 dias mostraram baixa eficácia na redução de lesões, e nenhuma cura clínica e parasitológica foi observada nos animais experimentais testados. Entretanto, o complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN) mostrou-se promissor em estudos *in vitro* contra *L. (V.) braziliensis*, devendo ser empregado em uma nova formulação e em um novo esquema de tratamento experimental.

Palavras-chave: leishmaniose, tratamento, complexo metálico, atividade antileishmania.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and, currently, the treatment of first choice is meglumine antimoniate. However, due to its limited effectiveness and high toxicity, it is necessary to seek new active principles. Thus, metal complexes, are gaining importance due to their effectiveness and low toxicity. In this context, the present study aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of the hypotoxic copper(I) complex [HB(pz)₃]Cu(PCN). For this, four dermatropic species of *Leishmania* were tested with the metal complex and its effectiveness was determined through parasitic viability and infectivity rate, and cytotoxicity was determined using a redox dye (resazurin). For the *in vivo* tests, the hamsters were infected and the lesions treated with a formulated ointment containing the complex; the effectiveness of which was assessed by measuring the diameter of the inoculum/snout location and determining the parasitic load. The results demonstrated moderate toxicity in murine macrophages and human monocytes and better efficacy in the species *L. (V.) braziliensis* when compared to the other species tested, with a 50% reduction in the viability of promastigotes and amastigotes forms (*in vitro*). General data from daily topical treatment for up to 30 days showed low efficacy for reducing lesions, and no clinical and parasitological cure was observed in the experimental animals tested. However, the [HB(pz)₃]Cu(PCN) complex proved to be promising in *in vitro* studies against *L. (V.) braziliensis*, and should be employed in a new formulation and a new experimental treatment scheme.

Keywords: leishmaniasis, treatment, metallic complex, antileishmanial activity

INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença negligenciada e endêmica em mais de 92 países, com mais de 90% dos casos ocorrendo nas Américas (WHO, 2021). A transmissão é vetorial e seus agentes etiológicos são os protozoários do gênero *Leishmania* (BLANCO, 2017). Atualmente, pelo menos 20 espécies são reconhecidamente patogênicas ao homem e, entre elas, um total de sete espécies dermatópicas são encontradas no Brasil. As espécies *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* se destacam no Brasil por sua ampla distribuição e indução de diferentes manifestações clínicas (TELES *et al.*, 2016).

No tratamento da LC, os antimoniais pentavalentes são os mais comumente empregados, sendo a pentamidina e a anfotericina B as drogas de segunda escolha. Porém, devido à baixa eficácia do medicamento, em decorrência da diversidade de espécies e

resistência parasitária, alta toxicidade, tratamento longo e doloroso, justifica-se a busca por novos princípios ativos com ação mais efetiva (BASTOS *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

Nesse contexto, os complexos metálicos têm recebido destaque, pois podem apresentar propriedades únicas, como a capacidade de contornar os mecanismos de resistência e a possibilidade de utilização do desenho de moléculas multialvos (compostos que podem atingir o organismo alvo por pelo menos dois mecanismos independentes) (ONG *et al.*, 2019). Os metais de transição possuem características peculiares que favorecem o desempenho em funções biológicas, e o cobre (Cu) é um metal de transição biologicamente ativo (KRUPANIDHI; SREEKUMAR; SANJEEVI, 2008).

Os compostos de cobre(I/II) foram amplamente avaliados quanto às suas propriedades antitumorais (TISATO *et al.*, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2019; PORCHIA *et al.*, 2020), mas também foram propostos para outros fins terapêuticos, como em uso como agentes antimaláricos (TAPANELLI *et al.*, 2017). Além disso, vários estudos investigaram a atividade de complexos de cobre em diferentes estados de oxidação, e complexos de Cu(II) mostraram resultados promissores *in vitro* contra *Leishmania* spp. (MAFFEI *et al.*, 2009; PORTAS *et al.*, 2012; ARNDT *et al.*, 2017; MÉNDEZ-ARRIAGA *et al.*, 2018).

O cobre é fisiologicamente internalizado pelas células eucarióticas como cobre(I), porém, na literatura, apenas Navarro *et al.* (2003) e Saeed *et al.* (2018) mostraram os resultados da atividade do complexo de cobre(I) contra formas promastigotas.

Com base nesses dados, e levando em consideração que drogas anticâncer podem exercer atividade antileishmania, decidimos estudar a ação do complexo metálico [HB(pz)₃]Cu(PCN) por apresentar atividade citotóxica em células cancerosas *in vitro* e *in vivo* (GANDIN *et al.*, 2014). Portanto, este estudo descreve a atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* do complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN) em *Leishmania* spp. e os efeitos da citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos.

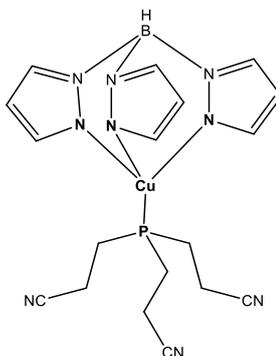
METODOLOGIA

Substância

A molécula alvo neste estudo foi o complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN), onde PCN = tris-cianometilfosfina e HBPz₃ = ânion trispirazolilborato (Figura 15). Este composto foi sintetizado e purificado conforme descrito anteriormente no estudo de Gandin *et al.* (2014), e

o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) foi utilizado como um medicamento de escolha padrão.

Figura 15 – Estrutura molecular de complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN) (PCN = tris-cianometilfosfina, HBPz₃ = ânion trispirazoliborato).



Fonte: Próprio autor (2021).

Parasitas

As cepas utilizadas nesse estudo foram *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2904) e *Leishmania (Viannia) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), cultivadas no meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brasil) – meio RPMI completo, incubado a 25 °C e mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM, BR.

Curva de crescimento

Para avaliar a curva de crescimento, formas promastigotas (10⁶ promastigotas/mL) foram adicionadas em tubos eppendorf (triplicata) contendo 500 µL de meio RPMI completo e incubadas a 25 °C. A cada 24 horas foi realizada a quantificação de parasitas viáveis em 10 µL, utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico Nikon Eclipse E200 (Nikon, Japão) em aumento de 400X. A quantificação de promastigotas viáveis foi realizada até a observação do período de declínio no crescimento e/ou morte dos parasitas (CUNHA, 2017).

Ensaio biológico de citotoxicidade

Macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos (cultura primária/ensaio individuais), foram cultivados em placas de 96 poços (10^5 células/mL) em meio RPMI completo, em uma incubadora de 5% de CO_2 (Forma Série II Water Jacket CO_2 Incubator, Thermo Scientific, USA) a 37°C . As células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04, 0,02 e 0,01 mM) ou Glucantime[®] (33, 16,5, 8,25, 4,12 e 2,06 mM). Os poços sem células foram mantidos em branco e os poços com células sem tratamento foram mantidos como controle. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando resazurina sal sódico (Sigma Aldrich[™], EUA) no período de 24, 48 e 72 horas com a adição de 10 μL de solução estoque de resazurina sal sódico (4 mg/mL em PBS) em cada poço e as placas foram novamente incubadas por mais 12 horas a 37°C . A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Elx800[™], BIO-TEK[®], Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram normalizados de acordo com a fórmula: % de sobrevivência = $\frac{\text{Abs. amostra} - \text{Abs. em branco}}{\text{Abs. controle} - \text{Abs. em branco}} \times 100$ (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Ensaio biológico em formas promastigotas

Promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^6 promastigotas/mL) em meio RPMI completo e tratadas com diferentes concentrações do complexo de cobre(I) ou do Glucantime[®], assim como utilizado nos ensaios biológicos de citotoxicidade. Poços com promastigotas sem tratamento foram mantidos como controle. A atividade biológica foi determinada pela quantificação de promastigotas viáveis em hemocítmetro, por um período de 24, 48 e 72 horas, por meio de microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com aumento de 400x. Os dados foram expressos como metade da concentração inibitória máxima (CI_{50}) e o índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da razão entre a citotoxicidade para monócitos humanos (CC_{50}) e a atividade contra promastigotas (CI_{50}) (CHAGAS *et al.*, 2021).

Ensaio biológico em formas amastigotas

A avaliação da atividade *in vitro* antileishmania em amastigotas, pelo complexo cobre(I) foi realizada conforme descrito por Nascimento *et al.* (2019), com algumas adaptações. Macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos (ensaios individuais), foram cultivados em meio RPMI completo e infectados com promastigotas de cada uma das espécies de *Leishmania* (10^6 parasita: 10^5 células) em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços, em seguida foram incubados a 5% de CO₂ a 37 °C por até 2 h. Após este tempo, as células infectadas foram mantidas somente em meio RPMI completo (controle) ou em diferentes concentrações do complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04 e 0,02) ou Glucantime[®] (33,00, 16,50, 8,25, 4,12) durante 24, 48 e 72 h a 37 °C em 5% de CO₂. A cada 24 horas as lamínulas foram fixadas e coradas pelo método Panótico Rápido (Laborclin[®], Paraná, Brasil) e analisadas por MO (microscopia óptica). A porcentagem de células infectadas foi determinada pela contagem aleatória de 100 células infectadas ou não infectadas em cada lamínula.

Formulações tópicas para ensaios biológicos *in vivo*

A pomada base hidrofóbica contendo o complexo de cobre foi preparada conforme adaptação da metodologia descrita por Patrício (2018). A pomada foi preparada com BHT (butil hidroxitolueno) 0,02%, propilenoglicol, 30% de lanolina anidra e vaselina sólida. Em seguida, foram adicionados 0,5 mg de complexo de cobre(I)/80 mg de pomada. Pomada base sem complexo de cobre(I) foi usada como controle de placebo.

Caracterização da formulação

Os parâmetro cor, odor, consistência, sedimentação e pH foram realizado conforme a ANVISA (2004) e os testes da formulação da pomada do complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN) foram realizados nos tempos zero (T0) e 30 (T30), utilizando como base a metologia de Matos (2016), com algumas adaptações, assim, cor e o brilho foram analisados à luz do dia; a consistência foi avaliada através do toque nas temperaturas - 6 °C, 5 °C, TA, 37 °C e 40 °C; o odor foi classificado em ausente, fraco, distinto ou forte; o pH foi aferido por determinação colorimétrica; a sedimentação foi realizada por meio da centrifugação de tubos Falcons contendo a pomada em rotação de 3000 rpm durante 30 minutos.

Ensaio biológicos *in vivo*

Noventa machos *hamsters* dourados (*Mesocricetus auratus*), pesando 120 g idade de 60 dias, foram mantidos no Biotério Central do INPA, com água e alimentos *ad libitum*, em salas com fotoperíodo e temperatura controladas (22 - 24 °C). Os noventa animais foram divididos em três grupos de trinta animais para o procedimento de infecção experimental; de cada grupo com 30 animais, 24 animais foram infectados por uma espécie de *Leishmania* estudada, os demais animais não foram infectados e constituíram os grupos controle. No focinho do hamster, 0,1 mL de solução salina estéril (0,9%) contendo formas promastigotas (10^6 promastigotas/mL) em fase estacionária foi injetada por via subcutânea. Após o surgimento da lesão, em tempos variáveis, de acordo com a espécie de *Leishmania*, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (seis animais por grupo) e tratados uma vez ao dia, diariamente, por vinte e cinco a trinta dias, da seguinte forma: I) Grupo não infectado e não tratado; II) Grupo infectado e não tratado; III) Grupo infectado e tratado com 80 mg de pomada base (placebo); IV) Grupo infectado e tratado com 20 mg/kg/dia de Glucantime[®] por via intramuscular; V) Grupo infectado e tratado com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg do complexo de cobre(I).

Ensaio *in vivo* com *L. (V.) naiffi* não foram realizados devido a ausência de lesões macroscópicas em hamsters.

Avaliação do tratamento experimental *in vivo*

Para a avaliação do tratamento, semanalmente, foi realizada a determinação do volume total da lesão por meio da mensuração do focinho com uso de paquímetro digital (mtx[®]), fotodocumentação das lesões para análise morfológica (COMANDOLLI-WYREPKOWKI *et al.*, 2017) e pesagem dos animais para verificação na variação do peso.

Eutanásia

Todos os animais estudados, foram anestesiados, conforme protocolo CEUA/INPA: 059/2018. Após o procedimento de eutanásia, os órgãos (fígado, baço e rins) foram coletados e pesados em balança analítica (AY220, Marte, Shimadzu, Brasil).

Avaliação parasitológica e hematológica do tratamento

Amostras de tecido seccionado da área da lesão de cada animal foi usada para impressão por aposição em lâminas, estas foram fixadas e coradas pelo método Panótico Rápido e analisadas por MO. A porcentagem de células infectadas foi determinada pela contagem aleatória de vinte e cinco campos em cada lamínula (COMANDOLLI-WYREPKOWKI *et al.*, 2017).

Fragmentos de tecidos de pele do local inoculado e tecido de vísceras (fígado) foram excisados assepticamente e cultivados em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle, 1908) por até 20 dias a 25 °C. Foi considerado positivo quando pelo menos uma forma do parasita era isolada no meio de cultura (COMANDOLLI-WYREPKOWKI *et al.*, 2017).

Foi realizado esfregação de sangue em lâminas e, posteriormente, o material biológico foi fixado e corado pelo método Panótico Rápido. Para a análise foi realizada a diferenciação e quantificação de células leucocitárias em microscópio óptico, 400x, por meio da contagem de 100 células por lâmina.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Usando regressão linear, o número de células vivas foi usado para calcular o valor de CI_{50} . (concentração inibitória para 50% dos parasitas vivos) e CC_{50} . Um teste estatístico ANOVA de uma via foi usado para avaliar a significância das diferenças entre os vários grupos, seguido pelo teste de Tukey para comparar as médias das diferenças entre os tratamentos, com 95% de confiança a ser considerado significativo.

Ética

Para os testes *in vitro*, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA/INPA: 014/2015) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CAAE: 29406319.2.0000.5020). Para os testes *in vivo*, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de INPA (CEUA/INPA: 059/2018).

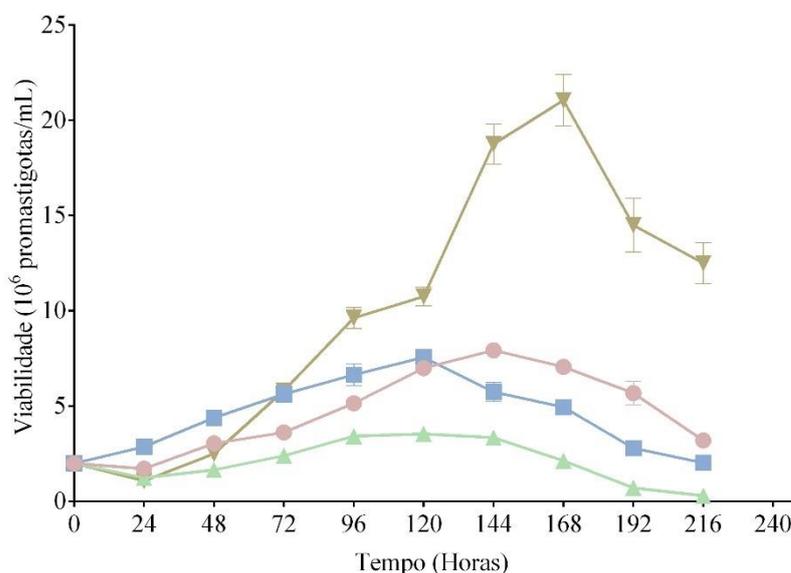
RESULTADOS

A proliferação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (fase logarítmica) ocorreu até o quarto dia, seguida da fase estacionária por volta do quinto dia, período em que um grande número de promastigotas metacíclicas foram observadas, seguido posteriormente pelo período de declínio (morte parasitária).

Diferentemente, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* apresentaram proliferação até o quinto dia e sexto dia, seguida de fase estacionária até por volta do sétimo dia, respectivamente, sendo observada a maior quantidade de formas metacíclicas neste período (Figura 16).

Assim, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas no quarto e quinto dia de cultivo, enquanto *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* foram utilizadas entre o quinto e o sétimo dia de cultivo em todos os testes biológicos.

Figura 16 – Curva de crescimento das espécies *Leishmania*. (*Leishmania*) *amazonensis* (linha azul), *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (linha rosa), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (linha verde) e *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* (linha marrom).



A avaliação da citotoxicidade demonstrou que o complexo cobre(I) apresentou leve citotoxicidade para macrófagos peritoneais murinos (média de 80% de viabilidade) e moderadamente citotóxico para monócitos humanos (média de 75% de viabilidade) O CC₅₀ do complexo de cobre(I) para ambos os tipos de células foi > 0,4 mM (a cima da concentração

testada) ao longo do período de incubação. A viabilidade celular no grupo tratado com Glucantime[®] foi de 80% e 85% (levemente citotóxico) e com dimetilsulfóxido (DMSO) foi de 86% e 93% (levemente citotóxico) em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos, respectivamente.

A atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* do complexo cobre(I) foi investigada contra diferentes espécies de *Leishmania*. Em relação aos experimentos *in vitro* realizados com promastigotas incubados nos períodos de 24, 48 e 72 h, o complexo cobre(I) apresentou menor CI₅₀ em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em 72 h (CI₅₀ 0,071 mM), seguido por *L. (V.) guyanensis* em 48 h (CI₅₀ 0,086 mM), *L. (V.) naiffi* em 72 h (CI₅₀ 0,096 mM) e *L. (L.) amazonensis* em 72 h (CI₅₀ 0,186 mM) e SI > 20 em 72 h para todas as espécies testadas (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentração Inibitória (CI₅₀ mM±SD) e índice de seletividade (IS) de [HB(pz)₃]Cu(PCN) e Glucantime[®] em formas promastigotas de *Leishmania* spp.

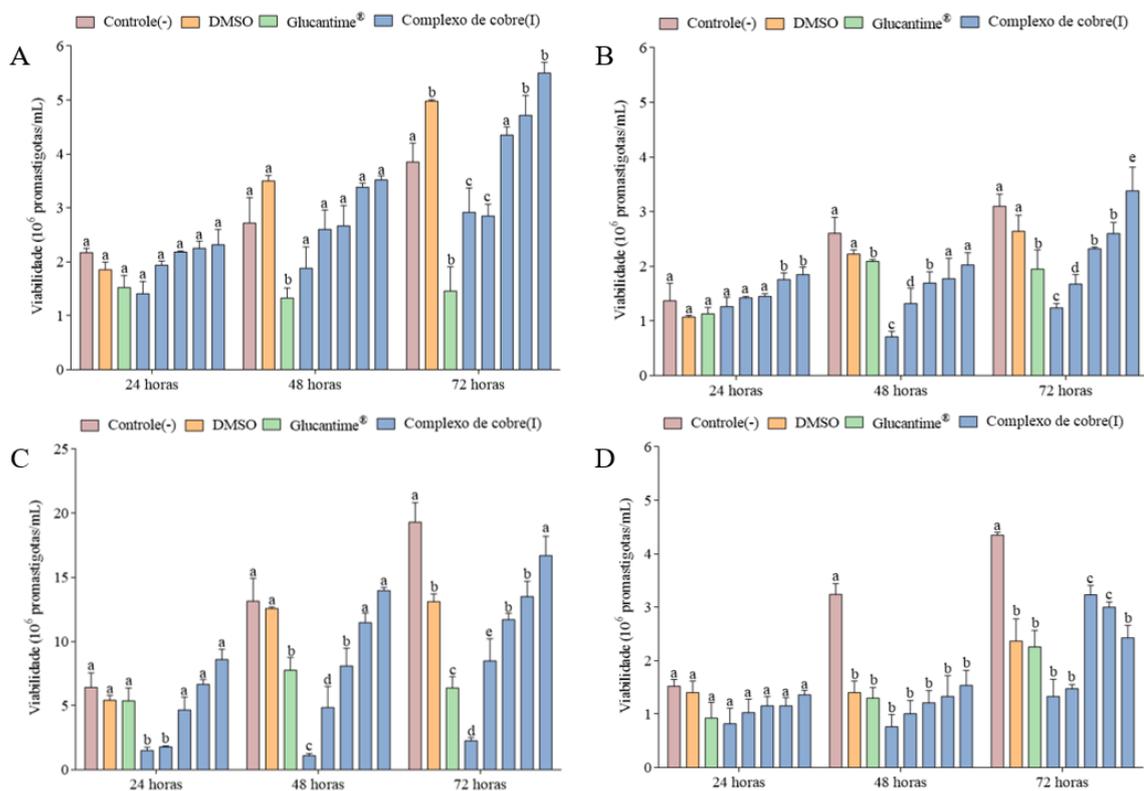
Espécie	Tempo	[HB(pz) ₃]Cu(PCN)		Glucantime [®]	
		CI ₅₀ (mM)	SI	CI ₅₀ (mM)	SI
<i>L. (L.) amazonensis</i>	24 h	0,216 ± 0,14	2,20	38,15 ± 0,15	10,32
	48 h	0,213 ± 0,25	3,71	26,13 ± 0,33	37,42
	72 h	0,186 ± 0,40	20,64	18,08 ± 0,21	85,45
<i>L. (V.) guyanensis</i>	24 h	0,300 ± 0,10	1,59	46,28 ± 0,09	8,51
	48 h	0,086 ± 0,23	0,08	93,12 ± 0,08	10,50
	72 h	0,117 ± 0,20	34,90	42,8 ± 0,47	36,10
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 h	0,094 ± 0,50	5,07	46,23 ± 0,42	8,52
	48 h	0,078 ± 0,83	9,71	31,34 ± 0,62	31,19
	72 h	0,071 ± 1,03	54,08	17,24 ± 0,68	89,62
<i>L. (V.) naiffi</i>	24 h	0,173 ± 0,19	2,75	40,71 ± 0,22	9,67
	48 h	<0,01 ± 0,53	75,8	25,96 ± 0,17	37,66
	72 h	0,096 ± 0,29	40	24,26 ± 0,36	63,68

L = *Leishmania*; V = *Viannia*.

A análise dos diferentes tratamentos mostrou que não houve diferença significativa na viabilidade parasitária de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. No entanto, observa-se que nas espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* as concentrações de 0,16 e 0,08 mM do

complexo cobre(I) induziram diminuição significativa ($p < 0,05$) na viabilidade parasitária, com a redução superior a 50% em 48 e 72 horas, enquanto em *L. (V.) braziliensis* essa redução é observada em todo o período de incubação. Além disso, observou-se que nessas espécies o complexo cobre(I) apresentou eficácia semelhante ao Glucantime[®] e, considerando todas as espécies, foi observado um efeito dependente da concentração (Figura 17).

Figura 17 –Viabilidade parasitária de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A); *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B), *Leishmania. (Viannia) braziliensis* (C) e *Leishmania (Viannia) naiffi* (D). Controle (promastigotas não tratadas), tratadas com DMSO (1%), Glucantime[®] (33 mM) ou complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04, 0,02 e 0,01 mM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.



Em relação aos experimentos *in vitro* realizados com amastigotas incubadas nos períodos de 24, 48 e 72 h, considerando ambos os modelos celulares, o complexo cobre(I) apresentou resultados promissores contra *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* no período de 72 h ($CI_{50} < 0,02$ mM) e *L. (V.) guyanensis* no período de 24 h ($CI_{50} < 0,081$ mM). Para *L. (V.) naiffi*, as concentrações testadas não foram eficazes na inibição de formas amastigotas ($CI_{50} > 0,16$ mM) (Tabela 8).

Tabela 8 – Concentração Inibitória máxima (CI₅₀ mM±SD) do complexo [HB(pz)₃]Cu(PCN) e Glucantime[®] em amastigotas de *Leishmania* spp. internalizadas em macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos.

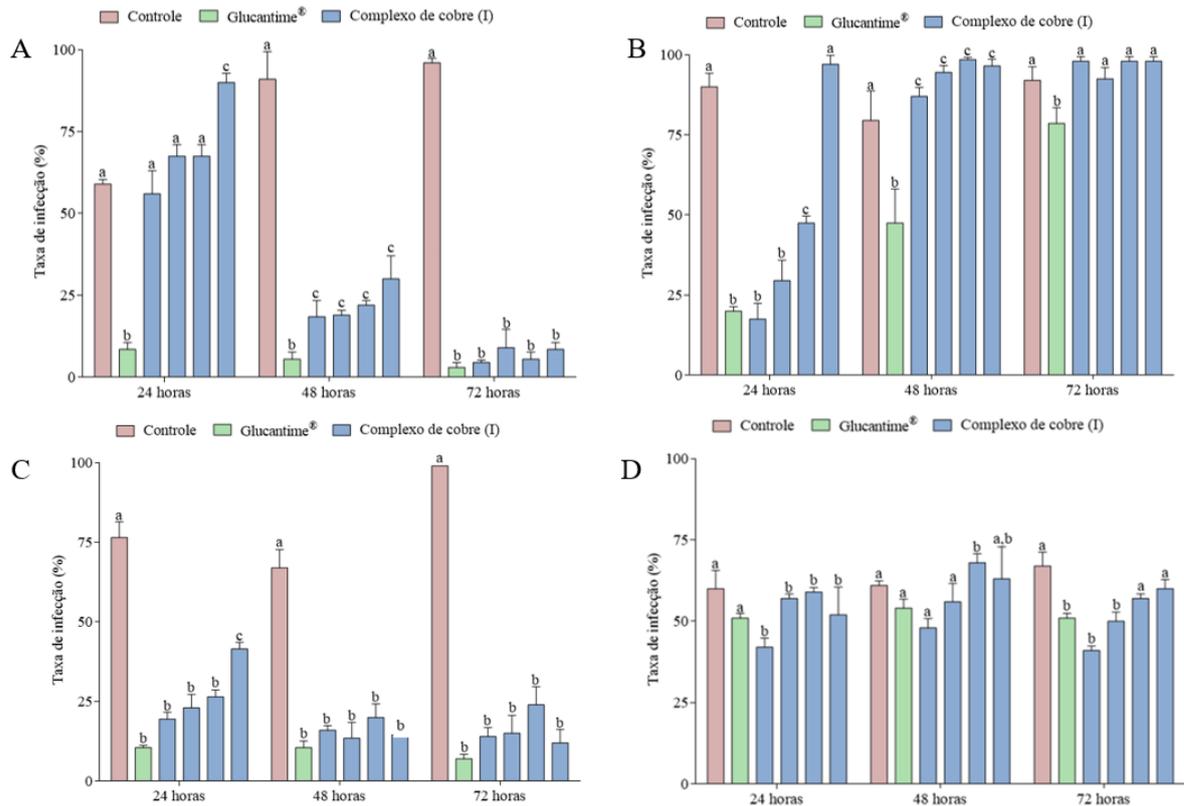
Espécies	Tempo	[HB(pz) ₃]Cu(PCN)		Glucantime [®]	
		Macrófagos	Monócitos	Macrófagos	Monócitos
<i>L. (L.) amazonensis</i>	24 h	0,321 ± 4,24	> 0,16	12,40 ± 3,00	8,73 ± 5,65
	48 h	< 0,02	0,107 ± 7,07	< 4 ± 3,00	75,75 ± 5,65
	72 h	< 0,02	0,355 ± 4,41	2,09 ± 2,47	224 ± 3,71
<i>L. (V.) guyanensis</i>	24 h	0,081 ± 4,06	< 0,2	21,51 ± 2,65	2,07 ± 3,61
	48 h	0,77 ± 1,94	0,43 ± 5,74	36,66 ± 5,12	147,87 ± 5,65
	72 h	21,24 ± 1,94	0,2	78,54 ± 3,18	244,39 ± 2,48
<i>L. (V.) braziliensis</i>	24 h	< 0,02	0,40 ± 4,59	4,35 ± 7,24	330,63 ± 7,77
	48 h	< 0,02	0,94 ± 4,24	< 4	< 4
	72 h	< 0,02	< 0,02 ± 3,42	< 4	< 4
<i>L. (V.) naiffi</i>	24 h	0,31 ± 3,53	1,45 ± 2,12	> 100 ± 3,53	81,99 ± 4,66
	48 h	0,29 ± 5,30	3,84 ± 0,96	> 100 ± 3,53	> 100 ± 1,23
	72 h	0,21 ± 2,12	5,1 ± 0,86	52,18 ± 5,65	>100 ± 0,97

L = *Leishmania*; V = *Viannia*.

Conforme observado nas formas promastigotas, o complexo de cobre(I) apresentou maior eficácia na espécie *L. (V.) braziliensis*, induzindo uma redução de 75% na taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos ($p < 0,05$) ao longo de todo o período de incubação. Além disso, observa-se que não houve diferença significativa para células tratadas com Glucantime[®]. Resultados semelhantes são observados em *L. (L.) amazonensis*, mas apenas no período de 48 e 72 horas.

Ao contrário destes, em *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* existe uma redução significativa no número de macrófagos peritoneais murinos infectados ($p < 0,05$) apenas em 24 horas (Figura 18). Vale ressaltar que a inibição da infectividade não foi observada em monócitos humanos, onde todos os grupos apresentaram altas taxas de infectividade.

Figura 18 – Taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (A); *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (B), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (C) e *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* (D). Controle (macrófagos peritoneais murinos não tratados), tratados com Glucantime® (33 mM) ou complexo de cobre(I) (0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 mM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.



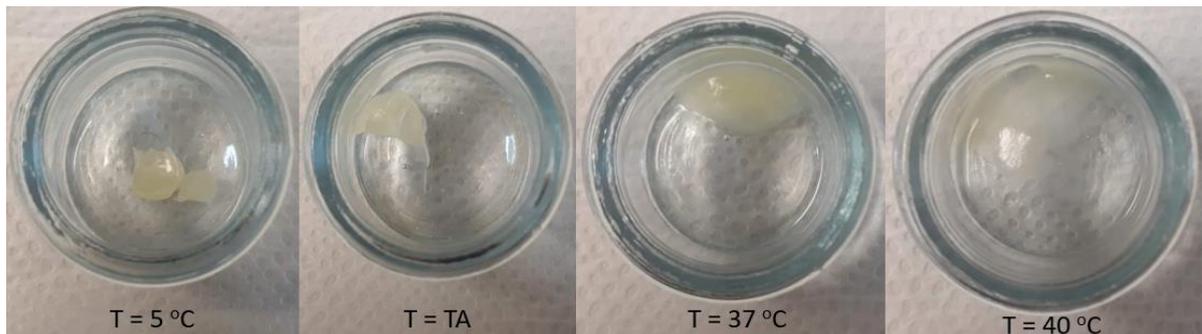
Nos ensaios *in vivo* hamster infectados foram tratados com pomadas contendo o complexo de cobre, assim, com a finalidade de determinar a qualidade do produto, foi averiguado características da pomada, no qual, observou-se que as pomadas (complexo de cobre(I) e placebo) não apresentavam odor no T(0) e T(30).

Em relação a cor, no período T(0) e T(30), observou-se que a pomada contendo o complexo de cobre apresentou um tom levemente escurecido (azulado), enquanto que a pomada placebo apresentou-se com um tom claro (amarelado). A pomada contendo complexo de cobre apresentou pH 6 e a pomada placebo pH 5.

Quanto a consistência, observou-se que ambas as pomadas (complexo de cobre(I) e placebo) apresentaram consistência similar nas diferentes temperaturas, após 12h, no período T(0) e T(30). Na temperatura -6°C ambas as pomadas apresentaram uma consistência

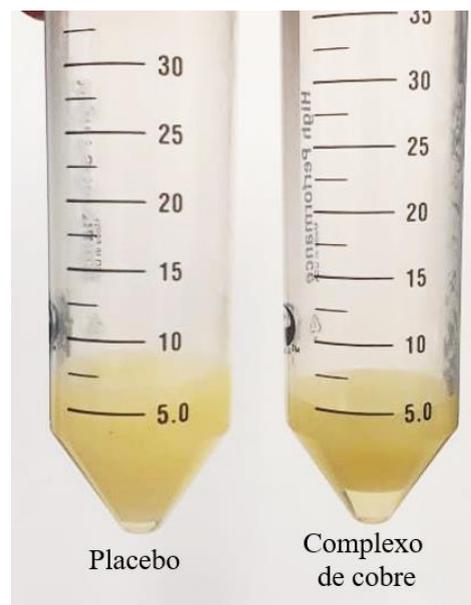
endurecida, cristalizada e brilhosa; na temperatura de 5 °C o aspecto era endurecido e brilhoso; em temperatura ambiente (TA) ambas as pomadas apresentaram consistência mediana, entretanto, a pomada com complexo de cobre apresentava-se com melhor espalhabilidade; em temperatura de 37 °C ambas as pomadas apresentaram consistência mole e em 40 °C ambas as pomadas apresetaram-se derretidas (Figura 19).

Figura 19 – Consistência da pomada de complexo de cobre em diferentes temperaturas em T(30).



No teste de sedimentação ambas as pomadas apresentaram separação de fases no período T(0) e T(30) (Figura 20).

Figura 20 – Pomadas (placebo e complexo de cobre) após a centrifugação.



No tratamento experimental em *hamsters*, os animais foram pesados a cada semana, e verificou-se que nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, o grupo infectado e não

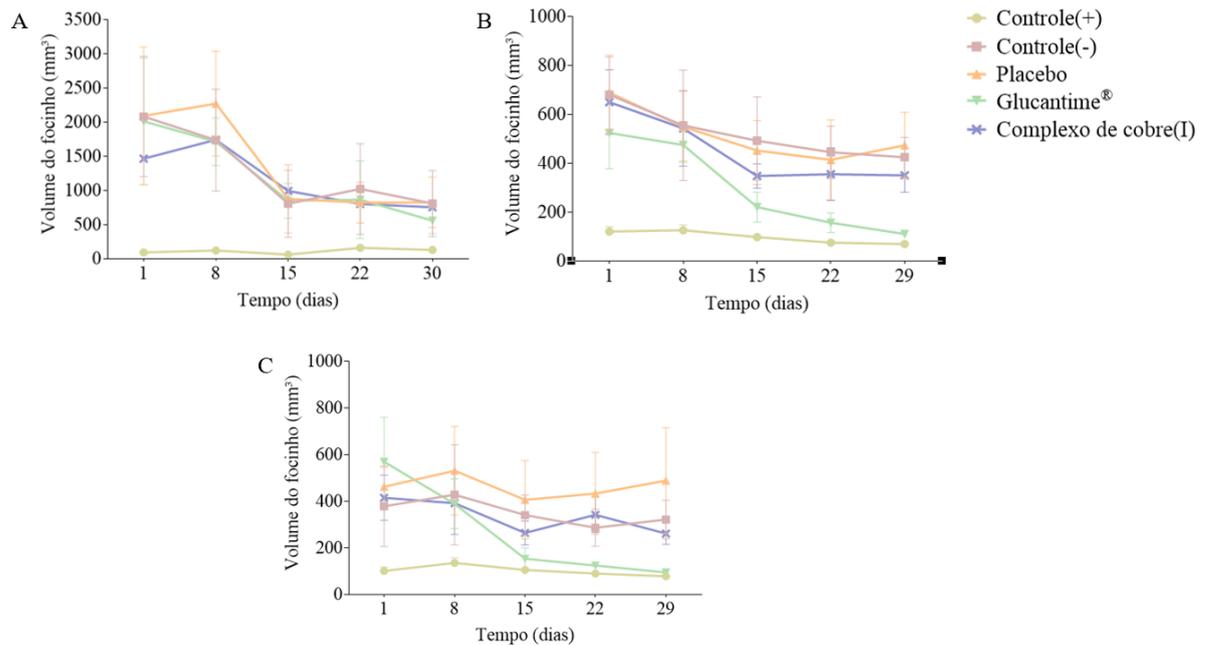
tratado apresentou maior peso (média de 173,33 g) do que os outros grupos (média de 150,16 g) ($p < 0,001$). Em *L. (V.) braziliensis* o grupo tratado com Glucantime[®] (média de 197,33 g) obteve peso superior aos demais grupos (média de 173,45 g) ($p < 0,0001$). Nos grupos infectados com *L. (V.) guyanensis*, não houve diferença no peso dos animais.

Quanto à evolução clínica da leishmaniose, observou-se que não houve diferença significativa no volume do focinho nos diferentes grupos de tratamento de *hamsters* infectados com *L. (L.) amazonensis*. O tratamento durou apenas 25 dias devido à apatia dos animais e evolução exacerbada das lesões.

Animais infectados com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* tratados com a pomada contendo complexo de cobre(I) apresentaram redução de apenas 17% e 18% no volume do focinho, respectivamente, no final do período de 30 dias. Não houve diferença significativa para o grupo de animais infectados e não tratados. No grupo Glucantime[®] o volume do focinho foi reduzido em 73% e 70%, respectivamente, apresentando diferença significativa para os outros grupos de tratamento ($p < 0,0474$) (Figura 21).

Observou-se também que os animais tratados com Glucantime[®] e a pomada com complexo de cobre(I) induziram redução no volume do focinho a partir do 15º dia em todas as espécies de *Leishmania* testadas.

Figura 21 – Volume do focinho de *hamsters* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (C). Hamster não infectado e não tratado (linha marrom), infectado e não tratado (linha rosa), infectado e tratado com placebo (linha laranja), infectado e tratado com 20 mg/kg/dia de Glucantime[®] por via intramuscular (linha verde) e infectado e tratado com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I) (linha azul).

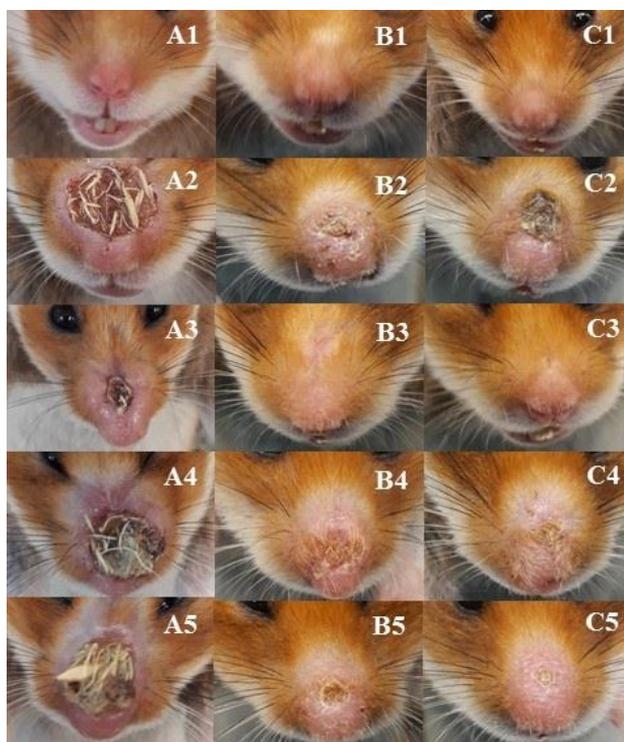


Em todos os grupos de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*, observou-se aumento gradativo do volume do focinho devido à formação do nódulo e edema até a segunda semana de tratamento. Após o 15º dia houve redução do edema e início da ulceração das lesões, observou-se que esses animais apresentaram maior volume no focinho quando comparados às demais espécies durante todo o período de experimentação, com lesões ulceradas, exacerbadas e presença de crosta. Nenhum dos grupos apresentou cura clínica.

Nos grupos infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, todos os grupos apresentaram formação de nódulos e nenhum dos grupos apresentou lesão com ulceração exacerbada, sendo as lesões com crosta mais frequentes. Os grupos que foram tratados por via intramuscular com Glucantime[®] para as espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* obtiveram 100% de cura clínica (cicatrização) ao final dos 30 dias de tratamento. Nos grupos infectados com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* e tratados com pomada de complexo de cobre(I), apenas 50% dos animais apresentaram cura clínica com cicatrização de feridas,

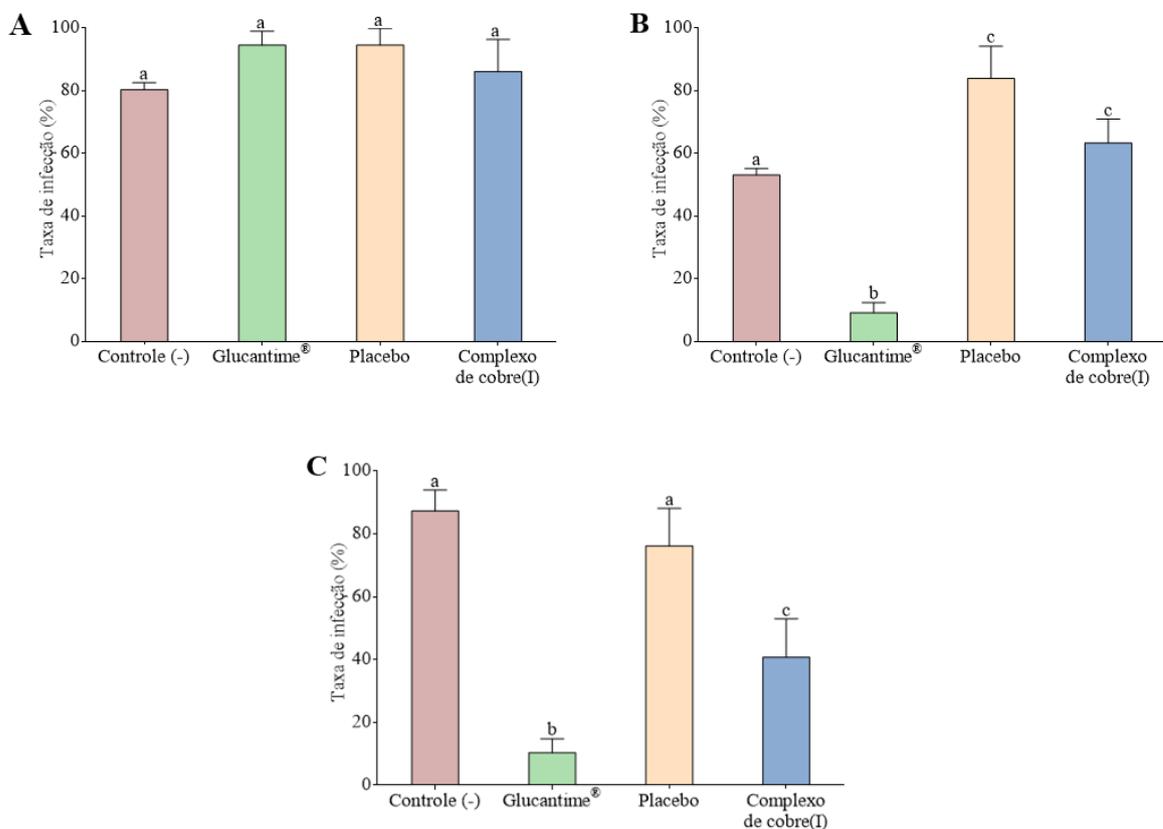
mas todos os animais independentemente do do tratamento apresentaram edema de focinho até o 30º dia de tratamento (Figura 22).

Figura 22 – Aspecto clínico das lesões em focinho de *Mesocricetus auratus* infectado por *Leishmania*. (*Leishmania*) *amazonensis* (A) no 25º dia de tratamento, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (B) e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (C) no 30º dia de tratamento. A1, B1, C1 - animal não infectado e não tratado. A2, B2, C2 - animal infectado e não tratado. A3, B3, C3 - animal infectado e tratado com Glucantime® (20 mg/kg/dia por via intramuscular). A4, B4, C4 - animal infectado e tratado com placebo. A5, B5, C5 - animal infectado e tratado com 80 mg pomade contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I).



Após o tratamento, a viabilidade parasitária foi verificada pela cultura NNN e revelou a presença de parasitas flagelados viáveis nas culturas de fragmentos da lesão e fígado em todos os grupos. A avaliação da taxa de infecção por impressão de lâmina obtida após o tratamento mostrou que não houve diferença entre os grupos de tratamento em animais infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os animais infectados com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentaram menor taxa de infecção (20%) quando tratados com Glucantime®, em contraste com os demais grupos de tratamento (> 50%) ($p < 0,0001$) (Figura 23).

Figura 23 – Taxa de infecção em macrófagos contada pela impressão em lâmina de fragmentos de lesões de *hamsters* infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A); *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (C). Animais infectados e não tratado (barra rosa), animais infectados e tratados com 20 mg/kg/dia de Glucantime® (barra verde), animais infectados e tratados com placebo (barra laranja) e animais infectados e tratados com 80 mg de pomada contendo 0,5 mg de complexo de cobre(I) (barras azuis). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes.



Não houve diferença significativa no peso dos órgãos (fígado, baço e rim) e nos parâmetros hematológicos entre os grupos experimentais para nenhuma das espécies testadas.

DISCUSSÕES

O tratamento atual contra a leishmaniose apresenta problemas de toxicidade, resistência parasitária, tratamento longo e doloroso. Assim, considerando as atividades

biológicas de diferentes complexos de cobre relatadas na literatura, decidimos verificar a citotoxicidade e atividade antileishmania do complexo $[HB(pz)_3]Cu(PCN)$ e compará-lo com o Glucantime[®], que atualmente é o fármaco de escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar no Brasil.

Em estudos *in vitro* e *in vivo* que requerem infecção, o período mais importante é o estacionário, pois neste momento as formas promastigotas são mais infecciosas (forma metacíclica) para o hospedeiro mamífero, assim, por meio da curva de crescimento foi possível determinar o período em que cada espécie estava em estágio metacíclico. A curva de crescimento determinada para espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* nesse estudo foi semelhante à curva analisada por Cunha (2017) e Celeste e Guimarães (1988), respectivamente, visto que nestes estudos o período estacionário ocorreu entre o quarto e sexto dia.

E a curva de crescimento determinada para *L. (V.) guyanensis* corroborou com o estudo de Campos (2008) em que a fase estacionária ocorreu entre o quinto e o sexto dia. Vale ressaltar que as condições de cultivo e origem das cepas podem causar diferença na curva de crescimento para as mesmas espécies analisadas em diferentes estudos (CELESTE; GUIMARÃES, 1988).

Nos ensaios biológicos de citotoxicidade, como esperado, o complexo de cobre(I) apresentou citotoxicidade leve a moderada, sendo esta classificada de acordo com o estudo de Oliveira (2009), com viabilidade celular ($> 75\%$, $CC_{50} > 0,4$ mM) semelhante ao observado em Glucantime[®]. Resultados semelhantes são descritos por Boutaleb-Charki *et al.* (2009), Caballero *et al.* (2014) e Méndez-Arriaga *et al.* (2020) que usando diferentes complexos de cobre(II) obtiveram CI_{50} de 186,61 μM , 558,6 μM e 813,5 μM em células da linhagem J774, respectivamente.

Nas formas promastigota e amastigota, o complexo cobre(I) apresentou menor CI_{50} ao longo do período de incubação quando comparado ao Glucantime[®], mas as espécies responderam de forma diferente aos tratamentos.

Nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, não houve inibição parasitária, entretanto, observou-se que o complexo cobre(I) apresentou melhor eficácia contra amastigotas desta espécie, com redução de 75% na taxa de infectividade no período de 48 e 72 h. Em resultados apresentados por Maffei *et al.* (2009), três complexos de cobre(II) apresentaram declínio do CI_{50} (48 e 72 horas), em *L. (L.) amazonensis*, demonstrando uma possível atividade de longo prazo para esta espécie.

Nas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, o complexo cobre(I) inibiu mais de 50% das formas promastigotas, com SI maior que 20 após 72 h e teve maior eficácia na inibição parasitária quando comparado ao Glucantime[®]. Nas formas amastigotas, o complexo de cobre(I) diminuiu a taxa de infecção em ao menos 75% e teve eficácia semelhante ao Glucantime[®].

Esses resultados corroboram os de Caballero *et al.* (2014), para os quais os complexos de cobre(II) apresentaram toxicidade semelhante ao Glucantime[®] nas formas promastigota e amastigota de *L. (V.) braziliensis*, e tiveram um SI maior que 54,2 após 72 h. Outros estudos, como os de Méndez-Arriaga *et al.* (2018) e Méndez-Arriaga *et al.* (2020), também relatam a atividade de complexos de cobre(II) em *L. (V.) braziliensis* e apresentam CI₅₀ de 100,2 µM (IS 14,5) e 42,6 µM (IS 19,1), respectivamente.

Em *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) naiffi* verificou-se que o complexo de cobre(I) apresentou melhor eficácia nas formas promastigotas e, até onde sabemos, não há estudos na literatura que avaliem a atividade antileishmania de complexos metálicos para essas espécies, sendo este o primeiro relato.

Assim, observa-se que o complexo cobre(I) *in vitro* apresentou citotoxicidade e atividade antileishmania semelhantes ao Glucantime[®], principalmente em *L. (V.) braziliensis*. Portanto, esses resultados *in vitro* estimularam a avaliação pré-clínica em *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania* spp.; sendo este o primeiro relato dos efeitos antileishmania de um complexo de cobre em um estudo pré-clínico com animais.

Os medicamentos usados atualmente para tratar a leishmaniose tegumentar são parenterais e apresentam graves efeitos adversos. Nesse sentido, a administração tópica de medicamentos para leishmaniose pode ser uma opção interessante, uma vez que o uso de medicamentos tópicos permite a concentração do princípio ativo no local da infecção. Oferece uma possível diminuição da toxicidade e por não ser invasivo, o tratamento pode ser feito fora do ambiente hospitalar (Bocxlaer *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento tópico também pode ser utilizado em conjunto com outras drogas, potencializando e reduzindo o tempo de tratamento da doença.

Devido às características lipofílicas do complexo de cobre(I), o uso de pomadas hidrofóbicas tornou-se uma alternativa atraente, pois possuem efeito emoliente, são difíceis de remover, não “secam” e, além disso, permitem que a droga permaneça no contato prolongado com a pele e atuar como curativo oclusivo (OTTO; FRANÇA; HOEFLER, 2018).

Outro fator relevante para o desenvolvimento de uma formulação tópica está associado à intoxicação por metais, pois embora o cobre seja um elemento essencial para diversas funções fisiológicas e bioquímicas, também está relacionado a doenças causadas pela abundância e deficiência desse metal no organismo. Assim, é necessário estipular doses para o tratamento que levem em consideração as concentrações diárias essenciais, que em um homem adulto, podem variar de 0,9 a 2,2 mg (BAIERLE *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no tratamento *in vivo*, demonstraram que nenhuma das substâncias testadas induziu a cura clínica (cicatrização de feridas) e cura parasitológica (ausência de parasitas) de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Em animais infectados com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* observou-se que embora a pomada de complexo de cobre(I) tenha induzido a redução no volume do focinho e da lesão, houve cura clínica somente na metade dos animais e não houve cura parasitológica, enquanto que os animais tratados com Glucantime[®] a cura clínica ocorreu em todos os animais, mas sem cura parasitológica; um fato que já foi demonstrado em humanos (MARTÍNEZ-VALENCIA *et al.*, 2017).

Embora diversos estudos *in vitro* com complexos metálicos tenham sido desenvolvidos na busca de novas alternativas de tratamento para a leishmaniose tegumentar, poucos avaliaram os efeitos *in vivo*. Entre eles, o estudo de Nascimento *et al.* (2019), que sugere um efeito leishmanicida promissor do complexo nitrosil de rutênio (300 µg/kg/dia, por via oral) contra *L. (V.) braziliensis* em um modelo de infecção cutânea *in vivo* (hamster), e que obteve 51% de redução do tamanho da lesão e 99,9% da eliminação dos parasitas. Em relação ao uso de tratamento tópico com complexos metálicos, não há informações disponíveis atualmente na literatura para o tratamento experimental da leishmaniose.

Outro fator relevante neste estudo é que não foram observadas reações tóxicas, alterações (tamanho, peso e aparência) de órgãos, como baço, rim e fígado e alterações na avaliação do leucograma, o que corrobora com o estudo de Nascimento *et al.* (2019).

Portanto, este trabalho permitiu verificar o efeito do complexo de cobre(I) *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies de *Leishmania* e os resultados encorajam novos estudos que avaliem a eficácia do complexo de cobre(I) em uma nova formulação e novo esquema de tratamento experimental. Notavelmente, a questão da permeação cutânea, modelo de experimentação animal, espécies de *Leishmania* envolvidas, concentrações do princípio ativo e tempo de tratamento são fatores determinantes na eficácia do tratamento.

CONCLUSÃO

O complexo cobre(I) apresentou atividade *in vitro* promissora contra as formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*. No estudo pré-clínico, houve redução de cerca de 17% e 18% no tamanho das lesões cutâneas em animais infectados com parasitas do subgênero *Viannia*, espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente, tratados topicamente com a pomada contendo o complexo de cobre(I).

Recomenda-se a realização de pesquisas adicionais utilizando diferentes concentrações, formulações, vias de administração e tempo de tratamento com o complexo de cobre(I), sendo também necessário elucidar o mecanismo terapêutico e os aspectos toxicológicos. Além disso, novas avaliações para averiguar a ação da pomada em uso concomitante com outros medicamentos para infecções parasitárias do subgênero *Viannia*.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Dr. Francesco Tisato, a MSc. Maricleide de Farias Naiff e ao Lorival Maciel Castro pela assistência.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1^a ed. Brasília. 2004. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ARNDT, A.; LIRIA, C. W.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MANCHINI, M. T.; ULIANA, S. R. B.; ESPÓSITO, B. P. New iminodibenzyl derivatives with anti-leishmanial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.172, p. 9–15. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013416302732>. Acesso em: 15 abr. 2020.

BAIERLE, M.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; MORO, A.; BARBOSA JUNIOR, F.; GARCIA, S. J. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 6, p. 463-479. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpml/v46n6/a06v46n6.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia antileishmaniose: Uma revisão bibliográfica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 2072-2104. 2016. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v8n6a21.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.3, p. 861-876. 2017. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v8n6a21.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2020.

BOCXLAER, K. V.; GAUKEL, E.; HAUSER, DEIRDRE.; PARK, S. H.; SCHOCK, S.; YARDLEY, V.; RANDOLPH, R.; PLATTNER, J. J.; MERCHANT, T.; CROFT, S. L.; JACOBS, R. T.; WRING, A. S. Topical Treatment for Cutaneous Leishmaniasis: DermatoPharmacokinetic Lead Optimization of Benzoxaboroles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n.5, p. e02419-17. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923108/>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BOUTALEB-CHARKI, S.; MARÍN, C.; MALDONADO, C. R.; ROSALES, M. J.; URBANO, J.; GUITIERREZ-SÁNCHEZ, R.; QUIRÓS, M.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Copper(II) Complexes effects Potential Anti-Parasitic Agents. **Drug Metabolism Letters**, v. 3, p. 35-44. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19356115/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2017. 2. Ed. Brasília-DF. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 11 mar. 2020.

CABALLERO, A. B.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; QUIRÓS, M.; SALAS, J. M.; HUERTA, O.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; MARÍN, C.; CHAVES-LEMAUR, G.; GUTIERREZ-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 526e534. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523414007533>. Acesso em: 15 abr. 2020.

CAMPOS, J. F. F. Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania*

(*Viannia*) *braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/1725>. Acesso em: 22 mai. 2020.

CELESTE, B. J.; GUIMARÃES, M. C. S. Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to schneider's drosophila medium as assessed by anti-leishmania human sera. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 30, n. 21, p. 63–67. 1988. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v30n2/01.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2020.

CHAGAS, A. F. S.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; SOLDERA, P. F.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; NAIFF, M. F.; FRANCO, A. M. R. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity of copper(I) complexes. *Acta Brasiliensis*, v.5, n. 1, p. 1-6. 2021. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/474/115>. Acesso em: 12 jun. 2021.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; JENSEN, B. B.; GRAFOVA, I.; SANTOS, P. A.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; BARCELLOS, J. F. M.; SILVA, A. L. da.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. *Acta Amazonica*, v. 47, n. 4, p. 331-340. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aa/v47n4/1809-4392-aa-47-04-00331.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2020.

CUNHA, B. C. **Avaliação da atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Minas Gerais: Universidade Federal de Ouro Preto, 2017. Disponível em: <https://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/8480>. Acesso em: 15 abr. 2020.

GANDIN, V.; TISATO, F.; DOLMELLA, A.; SANTINI, M. P.; SANTINI, C.; GIORGETTI, M.; MARZANO, C.; PORCHIA, M. *In vitro* and *in vivo* Anticancer Activity of Copper(I) Complexes with Homoscorpionate Tridentate Tris(pyrazolyl)borate and Auxiliary Monodentate Phosphine Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 11, p. 4745-4760. 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm500279x>. Acesso em: 15 abr. 2020.

HUSSAIN, A.; ALAJMI, M. F.; REHMAN, M. T.; AMIR, S.; HUSSAIN, F. M.; ALSALME, A.; SIDDIQUI, M. A.; ALKHEDHAIRY, A. A.; KHAN, R. A. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: *In vitro* and *in vivo* studies. *Scientific Reports*, v. 9, n. 5237, p. 1–17. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41063-x>. Acesso em: 15 abr. 2020.

KRUPANIDHI, S.; SREEKUMAR, A.; SANJEEVI, C. B. Copper & biological health. *Indian Journal of Medical Research*, v. 128, p. 448-461. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19106440/>. Acesso em: 22 mai. 2020.

MAFFEI, R. S.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B.; ESPÓSITO, B. P. Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial activity of copper(II) with fluorinated *α*-hydroxycarboxylate ligands. *Biometals*, v. 22, p. 1095–1101.

2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10534-009-9260-1>. Acesso em: 15 abr. 2020.

MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J.; DAZA-RIVERA, C. F.; ROSALES-CHIMALA, M.; COSSIO, A.; RICÓN, E. J. C.; DESAI, M. M.; SARAIVA, G. N.; GÓMEZ, M. A. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 11, p. :e0005713. 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pntd.0005713>. Acesso em: 12 jun. 2021.

MATOS, A. J. P. **Controle de qualidade físico-químico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia férrea* ex. *Caesalpinia férrea* L.** 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 2016. Disponível em: https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5663/11/Disserta%C3%A7%C3%A3o_AnselmoMato_s. Acesso em: 12 jun. 2021.

MÉNDEZ-ARRIAGA, J. M.; OYARZABAL, I.; ESCOLANO, G.; RODRÍGUEZ-DIEGUEZ, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; SALAS, J. M. *In vitro* leishmanicidal and trypanocidal evaluation and magnetic properties of 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine Cu(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 180, p. 26–32. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013417305822>. Acesso em: 11 mar. 2020.

MÉNDEZ-ARRIAGA, J. M.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. *In vitro* leishmanicidal activity of copper(II) 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pyrimidine Derivatives as [1,5-a]pyrimidine complex and analogous transition metal series. **Polyhedron**, v. 176, v. 114272, p. 1–6. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S027753871930717X>. Acesso em: 22 mai. 2020.

NASCIMENTO, N. R. F.; DE AGUIAR, F. L. N.; SANTOS, C. F.; LUNA COSTA, A. M.; DE JESUS HARDOIM, D.; DA SILVA CALABRESE, K.; GADELHA ROCHA, M. F. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 196, p. 61–65. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18307381>. Acesso em: 11 mar. 2020.

NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; ARRIECHE, D.; MARCHAN, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 364-369. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568241/>. Acesso em: 11 mar. 2020.

NICOLLE, C. Culture du parasite du bouton d'orient. **CR Academic Science**, v. 146, p. 842-843. 1908.

OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana.** 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1534/1/417400.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ONG, Y. C.; ROY, S.; ANDREWS, P. C.; GASSER, G. Metal Compounds against Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, v. 119, p. 730-796. 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.8b00338>. Acesso em: 11 mar. 2020.

OTTO, V.; FRANÇA, F.; HORFLER, R. Formas farmacêuticas semissólidas para tratamento tópico. **Fármaco Terapêutica**, p. 3-9. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/24266335_Copper_II_Complexes_of_124Triazolo_15-aPyrimidine_Derivatives_as_Potential_Anti-Parasitic_Agents. Acesso em: 11 mar. 2020.

PATRÍCIO, S. M. DA. S. **Incorporação do óleo de nim em pomada hidrofóbica**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/6690/1/SAMARA%20MARQUES%20DA%20SILVA%20PATR%20c3%8dCIO%20-%20TCC%20FARM%20c3%81CIA%202018.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2020.

PORCHIA, M.; TISATO, F.; ZANCATO, M.; GANDIN, V.; MARZANO, C. *In vitro* antitumor activity of water-soluble copper(I) complexes with diimine and monodentate phosphine ligands. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 998-1010. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217301715>. Acesso em: 11 mar. 2020.

PORTAS, A. S.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B.; ESPÓSITO, B. P. Increasing the activity of copper(II) complexes against *Leishmania* through lipophilicity and pro-oxidant ability. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 107–112. 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-011-0834-3>. Acesso em: 22 mai. 2020.

SAEED, A.; LARIK, F. A.; JABEEN, F.; MEHFOOZ, H.; GHUMRO, S. A.; EL-SEEDI, H. R.; ALI, M.; CHANNAR, P. A.; ASHRAF, H. Synthesis, Antibacterial and Antileishmanial Activity, Cytotoxicity, and Molecular Docking of New Heteroleptic Copper(I) Complexes with Thiourea Ligands and Triphenylphosphine. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 541–550. 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1070363218030246>. Acesso em: 11 mar. 2020.

TAPANELLI, S.; HABLUETZEL, A.; PELLEI, M.; MARCHIÒ, L.; TOMBESI, A.; CAPPARÈ, A.; SANTINI, C. Novel metalloantimalarials: Transmission blocking effects of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) phosphane complexes on the murine malaria parasite *Plasmodium berghei*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 166, p. 1–4. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27815977/>. Acesso em: 22 mai. 2020.

TELES, C. B. G.; SANTOS, A. P. A.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; RODRIGUES, M. S.; PESSOA, F. A. C.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, L. M. A. Phebotoxine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian with Peru and Bolívia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 17, p. 1678–8060. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/mioc/v111n7/0074-0276-mioc-0074-02760160054.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2020.

TISATO, F.; MARZANO, C.; PERUZZO, V.; TEGONI, M.; GIORGETTI, M.; DAMJANOVIC, M.; TRAPANANTI, A.; BAGNO, A.; SANTINI, C.; PELLEI, M.; PORCHIA, M.; GANDIN, V. Insights into the cytotoxic activity of the phosphane copper(I) complex $[\text{Cu}(\text{thp})_4][\text{PF}_6]$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 165, p. 80–91. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013416302021>. Acesso em: 22 mai. 2020.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 23 jun. 2020.

Capítulo 2

Atividade antileishmania de complexos de paládio(II)

Capítulo 2

Atividade antileishmania de complexos de paládio(II)

Ana Flávia da Silva Chagas^{1,2*}, Anny Maíza Vargas Brasil^{1,2}, Andriy Grafov³, Antonia Maria Ramos Franco².

¹Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³Departamento de Química, Universidade de Helsinque - Helsinque, Finlândia.

*Autor correspondente: chagas.afs@gmail.com

RESUMO

Atualmente o antimoniato de meglumina consiste na droga de primeira escolha no Brasil para o tratamento da leishmaniose, entretanto, há um incentivo para a busca de novos princípios ativos que possam ser mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento da leishmaniose. Assim, levando em consideração o relato na literatura de pesquisas com complexos de paládio com atividade *in vitro* promissora para diferentes espécies de *Leishmania* spp. esta pesquisa teve como objetivo sintetizar três complexos de paládio e avaliar a atividade antileishmania e citotóxica. Para isso, formas promastigota e amastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* foram expostas a complexos de paládio e a eficácia foi determinada pela viabilidade parasitária e taxa de infectividade, e a citotoxicidade foi determinada pelo método colorimétrico com resazurina. Os complexos de paládio(II) inibiram ao menos 50% das formas promastigotas apresentando $CI_{50} < 0,0038$ mM e em amastigotas a inibição da infecção foi de 20%, para ambas as espécies testadas, apresentando resultados semelhantes ao Glucantime[®]. Em relação a citotoxicidade observou-se toxicidade moderada com taxa de viabilidade celular de 68,14%, 69,66% e 62,15% em Pd(1), Pd(2) e Pd(3), respectivamente; essa citotoxicidade foi superior ao observado em Glucantime[®] (80%). Assim conclui-se que os complexos de paládio apresentaram eficácia na inibição de formas promastigotas, principalmente contra *L. (L.) amazonensis*, porém, não apresentaram a mesma eficácia em formas amastigotas e apresentaram citotoxicidade superior quando comparados ao Glucantime[®], assim, os complexos de Pd(II) testados nesse estudo não apresentam melhor eficácia quando comparado ao Glucantime[®].

Palavras-chave: complexos de coordenação, leishmaniose, elementos de transição.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma antropozoonose causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos (PINTO *et al.*, 2020). Segundo a World Health Organization (2021) ao menos 92 países são endêmicos ou apresentam notificação de casos de LT, sendo esta considerada um grave problema de saúde pública e classificada como uma doença negligenciada. A manifestação da doença se dá em forma de lesões na pele e na mucosa semelhantes a úlceras que podem estar isoladas ou espalhadas pelo corpo, sendo estas indolores.

O tratamento para a leishmaniose é medicamentoso e no Brasil os tratamentos preconizados são fornecidos pelo Sistema Único de Saúde e os medicamentos disponíveis atualmente são antimoniatos de meglumina, o isetionato de pentamidina, a anfotericina B e a miltefosina, mas estes medicamentos possuem diversos efeitos colaterais, são de uso prolongado e o processo para a obtenção da cura clínica (cicatrização das lesões) pode vir a ser demorado, pois esta a resposta terapêutica depende de vários fatores como tipo de pele, genética, estado imunológico, espécie infectante, doenças associadas, entre outros (FILHO *et al.*, 2020).

Nesse contexto, complexos metálicos são alternativas atraentes, pois a interação entre um íon metálico e um ligante pode produzir compostos com diferentes geometrias, estados de oxidação e números de coordenação, proporcionando o desenvolvimento de novos fármacos com alta atividade e baixa toxicidade (ISLAM *et al.*, 2014). Diversas pesquisas estão sendo realizadas para o desenvolvimento de drogas à base de metais (Co, Ni, Cu, Pt, Ru e Pd) de transição que apresentam menor toxicidade e atividade biológica (CUNHA *et al.*, 2020).

Os complexos de paládio têm recebido destaque nas últimas décadas devido à diversidade estrutural, reatividades e aplicações, principalmente no campo das atividades antiproliferativas e organo-catálise (KHAN *et al.*, 2018). Além disso, vários estudos relatam a atividade antileishmania *in vitro* de complexos de paládio em formas promastigota e amastigota de *Leishmania* spp. (CUNHA *et al.*, 2020; PATRA *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2018; VELÁSQUEZ *et al.*, 2016; FRANCO *et al.*, 2013).

Portanto, esta pesquisa teve como objetivo sintetizar complexos de paládio e avaliar a atividade antileishmania e citotóxica.

METODOLOGIA

Síntese dos complexos de Pd(II)

Preparação de solução $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$

Utilizando uma balança analítica (AY220, Marte, Shimadzu, Brasil) e um béquer (50 mL) foi pesado 1,082 g (6,1 mmol) do PdCl_2 , posteriormente foi adicionado 4 mL de cloreto de sódio (0,9%), 21 mL de água destilada e algumas gotas de HCl concentrado. Para a total dissolução do PdCl_2 , a mistura foi levada ao agitador em banho maria a 40°C . Após a dissolução a substância foi colocada em em uma placa petri de vidro deixada sob fluxo de ar a temperatura ambiente para total evaporação, tornando-se um composto seco de coloração marrom ($\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$). Posteriormente, 55,31 mg do $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$ foi diluído em 10 mL de cloreto de sódio (0,9%) e reservado em frasco de vidro.

Preparação de soluções-estoque dos ligantes

Ácido etidrônico, ácido monohidratado (1-Hidroxi-etilideno) bisfosfônico monohidrato.

Utilizando balança analítica e um béquer foi pesado 21,06 mg do ácido etidrônico (AE), em seguida foi adicionado 4 mL de cloreto de sódio (0,9%), após uma leve agitação com bastão de vidro, foi adicionado aos poucos solução de NaOH (1,0 M) para ajustar o pH até 7.0 (em torno de 0.5 mL de NaOH), em seguida foi ajustado para o volume final até 5 mL com cloreto de sódio (0,9%), filtrado em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ e reservado em frasco de vidro.

Prodonato de sódio, monohidrato (sal monossódico do ácido 2-pirolidinil-1-hidroximetano-1,1-bisfosfônico)

Utilizando balança analítica e um béquer foi pesado 28,30 mg do sódio protonato (PS), em seguida foi adicionado 4,5 mL de cloreto de sódio (0,9%), após uma leve agitação com bastão de vidro, foi ajustado para o volume final até 5 mL com cloreto de sódio (0,9%), filtrado em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ e reservado em frasco de vidro.

Ibandronato de sódio, monohidrato (sal monossódico do ácido 1-hidroxi-3-(metilpentilamino)propilideno)bisfosfônico)

Utilizando balança analítica e um béquer foi pesado 33,77 mg do sódio ibandronato (IS), em seguida foi adicionado 4,5 mL de cloreto de sódio (0,9%), após uma leve agitação com bastão de vidro, foi ajustado para o volume final até 5 mL com cloreto de sódio (0,9%), filtrado em membrana de 0,22 µm e reservado em frasco de vidro.

Preparação de complexos do paládio

Para a preparação dos complexos de paládio em três béqueres diferentes foi adicionado 2,5 mL da solução-estoque do Na₂[PdCl₄] e posteriormente em cada béquer foi adicionado 2,5 mL de uma das solução-estoque de ligante. Posteriormente esses béqueres foram deixados por 24 horas sob agitação moderada a temperatura ambiente, em seguida foram filtrados (membrana 0,22 µm) e reservados em frascos de vidro para serem posteriormente utilizados nos ensaios biológicos.

Parasitas

As cepas utilizadas nesse estudo foram *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), cultivadas no meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brasil) – meio RPMI completo, incubado a 25 °C e mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM, BR.

Ensaio biológicos de citotoxicidade

Macrófagos peritoneais murinos e monócitos humanos (cultura primária/ensaio individuais), foram cultivados em placas de 96 poços (10⁵ células/mL) em meio RPMI completo, em uma incubadora de 5% de CO₂ (Forma Série II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Scientific, USA) a 37 ° C. As células foram tratadas com diferentes concentrações

dos complexos de Pd(II) (0,06, 0,03, 0,015, 0,0075 e 0,0038 mM) ou Glucantime[®] (33, 16,5, 8,25, 4,12 e 2,06 mM). Os poços sem células foram mantidos em branco e os poços com células sem tratamento foram mantidos como controle. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando resazurina sal sódico (Sigma Aldrich[™], EUA) no período de 24, 48 e 72 horas com a adição de 10 µL de solução estoque de resazurina sal sódico (4 mg/mL em PBS) em cada poço e as placas foram novamente incubadas por mais 12 horas a 37 °C. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Elx800[™], BIO-TEK[®], Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram normalizados de acordo com a fórmula: % de sobrevivência = Abs. amostra-Abs. em branco/Abs. controle-Abs. em branco × 100 (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Ensaio biológico em formas promastigotas

Promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^6 promastigotas/mL) em meio RPMI completo e tratadas com diferentes concentrações dos complexos de Pd(II) ou do Glucantime[®], assim como utilizado nos ensaios biológicos de citotoxicidade. Poços com promastigotas sem tratamento foram mantidos como controle. A atividade biológica foi determinada pela quantificação de promastigotas viáveis em hemocítmetro, por um período de 24, 48 e 72 horas, por meio de microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com aumento de 400x. Os dados foram expressos como metade da concentração inibitória máxima (CI₅₀) (CHAGAS *et al.*, 2021).

Ensaio biológico em formas amastigotas

A avaliação da atividade *in vitro* antileishmania em amastigotas, pelos complexos de Pd(II) foi realizada conforme descrito por Nascimento *et al.* (2019), com algumas adaptações. Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em meio RPMI completo e infectados com promastigotas de cada uma das espécies de *Leishmania* (10^6 parasita: 10^5 células) em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços, em seguida foram incubados a 5% de CO₂ a 37 °C por até 2 h. Após este tempo, as células infectadas foram mantidas somente em meio RPMI completo (controle) ou com diferentes concentrações dos complexos de Pd(II) (0,06, 0,03, 0,015 e 0,0075 mM) ou Glucantime[®] (33, 16,5, 8,25 e 4,12 mM) durante 24, 48 e 72 h a 37 °C em 5% de CO₂. A cada 24 horas as lamínulas foram fixadas e coradas pelo

método Panótico Rápido (Laborclin[®], Paraná, Brasil) e analisadas por MO (microscopia óptica). A porcentagem de células infectadas foi determinada pela contagem aleatória de 100 células infectadas ou não infectadas em cada lamínula.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Usando regressão linear, o número de células vivas foi usado para calcular o valor de CI_{50} . (concentração inibitória para 50% dos parasitas vivos) e CC_{50} . Um teste estatístico ANOVA de uma via foi usado para avaliar a significância das diferenças entre os vários grupos, seguido pelo teste de Tukey para comparar as médias das diferenças entre os tratamentos, com 95% de confiança a ser considerado significativo.

Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA/INPA: 014/2015).

RESULTADOS

Após a síntese foram obtidos os complexos $[PdCl_2(C_9H_{19}NNaO_7P_2)_2]^{-2}$ (**1**), $[PdCl_2(C_2H_8O_7P_2)]_2^{-2}$ (**2**) e $[PdCl_2(C_5H_{12}NNaO_7P_2)_2]^{-2}$ (**3**).

Os complexos de Pd(II), ligantes e Glucantime[®] foram avaliados quanto a citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e os dados obtidos demonstraram que os complexos de Pd(II) apresentam citotoxicidade moderada, os ligantes ibandronato de sódio (IS), ácido etidrônico (AE) e prodonato de sódio (PS) avaliados individualmente apresentaram citotoxicidade severa e o Glucantime[®] leve citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos. Ressalta-se que exceto em Pd(3) a viabilidade celular foi diminuindo com o decorrer do tempo de incubação (Tabela 9).

Tabela 9 – Viabilidade celular média (%) de macrófagos peritoneais murinos na presença de complexos de Pd(II), ibandronato, iedrônico, prodonato e Glucantime[®].

Substâncias	Viabilidade celular (%)		
	24 h	48 h	72h
Pd (1)	69,35 ± 3,37	68,72 ± 8,08	66,37 ± 3,16
Pd (2)	70,90 ± 3,07	70,78 ± 3,79	67,30 ± 1,05
Pd (3)	61,56 ± 2,94	55,17 ± 2,15	69,71 ± 4,81
IS	49,52 ± 2,09	43,97 ± 2,15	41,74 ± 1,81
AE	55,08 ± 5,72	55,17 ± 5,62	42,60 ± 3,26
PS	41,40 ± 6,41	40,77 ± 3,93	38,22 ± 2,18
Glucantime [®]	89,9 ± 0,44	89,8 ± 1,86	82,84 ± 2,81

Em testes biológicos com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, todos os complexos de Pd(II) e o ligante IS apresentaram concentração inibitória média inferior a concentração testada ($CI_{50} < 0,0038$). Em *L. (V.) guyanensis* essa atividade é observada nos complexos de Pd(II) e nos ligantes AE e PS no período de 48 e 72 horas. Quando comparado ao Glucantime[®], os complexos de Pd(II) e os ligantes apresentaram menor concentração inibitória. (Tabela 10).

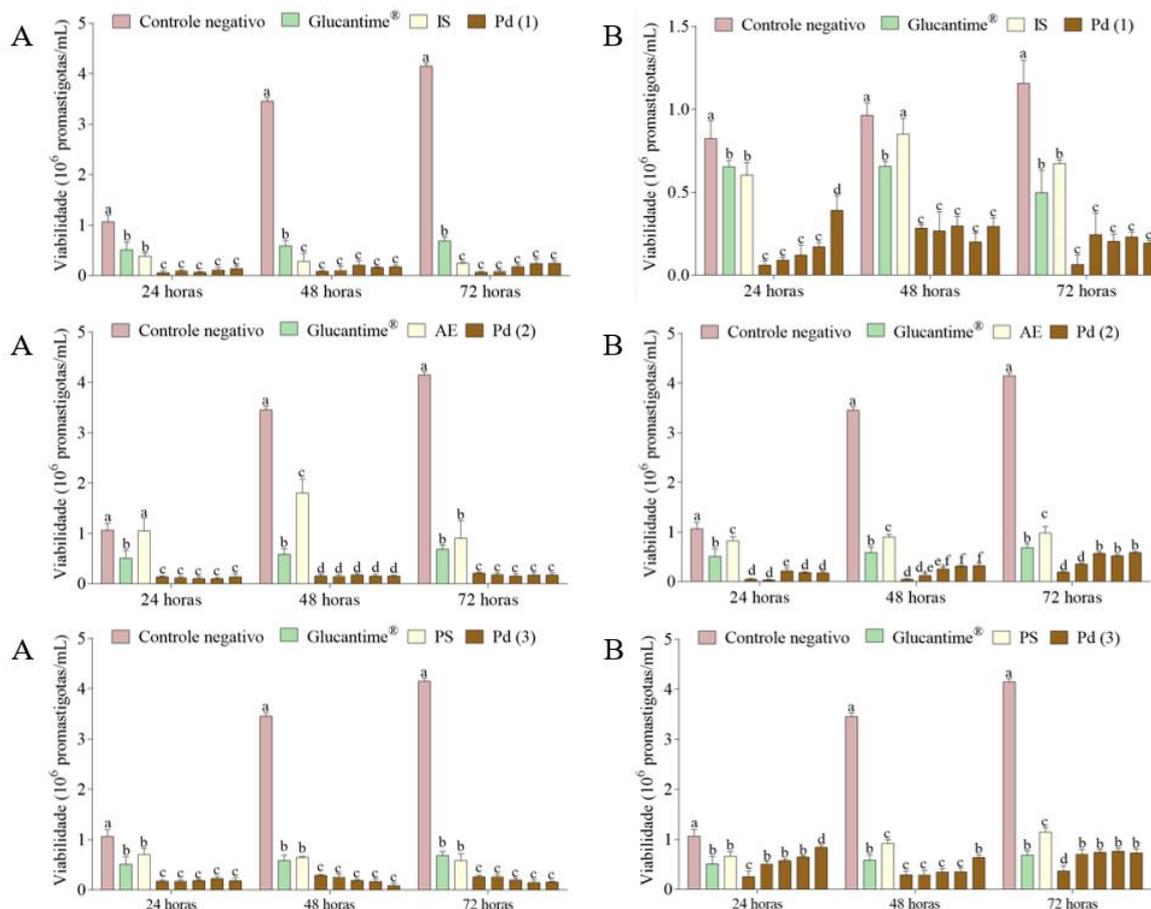
Tabela 10 – Metade da concentração inibitória máxima (CI₅₀ mM±SD) dos complexos de paládio, Glucantime[®], ibandronato de sódio, prodonato de sódio e ácido etidrônico em promastigotas de *Leishmania* spp.

Substâncias	<i>L. (L.) amazonensis</i>		
	24 h	48 h	72h
Pd (1)	< 0,0038	< 0,0038	< 0,0038
Pd (2)	< 0,0038	< 0,0038	< 0,0038
Pd (3)	< 0,0038	< 0,0038	< 0,0038
IS	< 0,0038	< 0,0038	< 0,0038
AE	0,041 ± 0,13	0,014 ± 0,25	0,02 ± 0,38
PS	0,075 ± 0,06	< 0,0038	< 0,0038
Glucantime [®]	9,57 ± 0,14	< 2,06	< 2,06
Substâncias	<i>L. (V.) guyanensis</i>		
	24 h	48 h	72h
Pd (1)	0,0073 ± 0,05	< 0,0038	< 0,0038
Pd (2)	< 0,0038	< 0,0038	< 0,0038
Pd (3)	0,04 ± 0,01	< 0,0038	< 0,0038
IS	0,08 ± 0,06	0,18 ± 0,07	0,057 ± 0,08
AE	0,14 ± 0,07	< 0,0038	< 0,0038
PS	0,14 ± 0,05	< 0,0038	< 0,0038
Glucantime [®]	7,77 ± ± 0,09	2,35 ± 0,09	< 2,06

Analisando individualmente observa-se que todas as concentrações testadas dos complexos de Pd(II) foram capazes de inibir mais de 50% das formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* em relação ao controle negativo ($p < 0,001$) e apresentou diferença significativa para o Glucantime[®] ($p < 0,05$) (Figura 24A).

Em *L. (V.) guyanensis* essa atividade é observada a partir de 48 horas. Além disso, observa-se que o Pd (2) conseguiu inibir mais de 50% das promastigotas durante todo o período de incubação com diferença ao controle negativo ($p < 0,001$) e apresentou diferença significativa para o Glucantime[®] ($p < 0,05$). Os complexos Pd (2) e Pd (3) apresentaram resultados semelhantes a partir de 48 horas (Figura 24B).

Figura 24 – Viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B) expostas ao Glucantime® (33 mM), complexos de Pd(II) (0,06 a 0,0038 mM) e ibandronato de sódio, prodonato de sódio e ácido etidrônico (0,06 mM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.



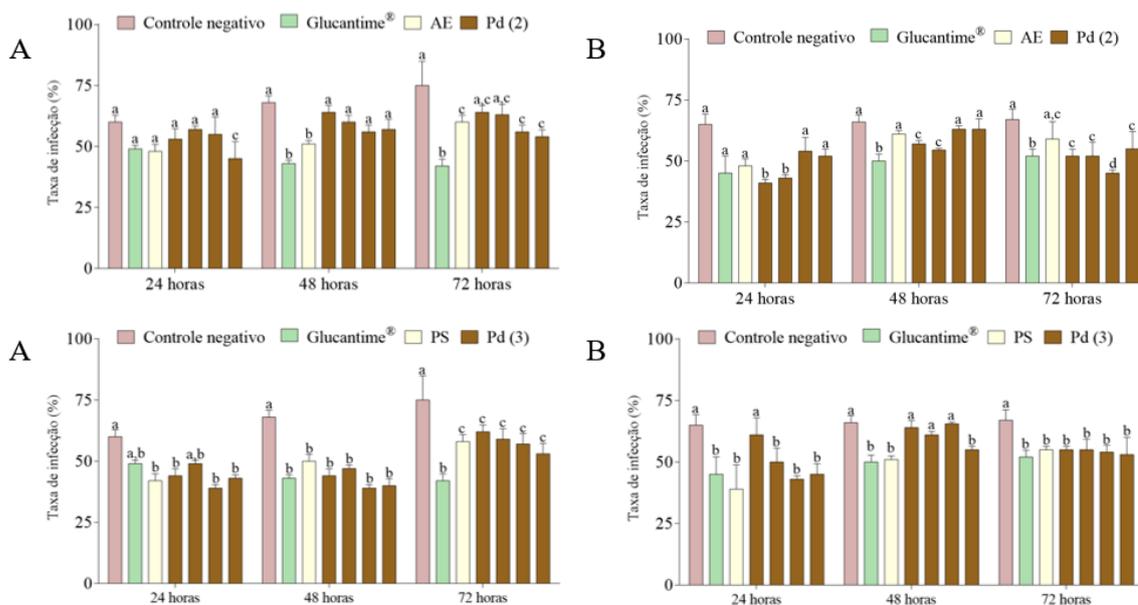
Em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, verificou-se que Pd (3) no período de 24 e 48 horas induziu a redução de 10 a 20% na taxa de infecção em relação ao controle negativo, atividade semelhante ao Glucantime®, enquanto o Pd (2) não foi eficaz na redução da taxa de infectividade, apresentando resultado semelhante ao controle negativo (Figura 25A).

Em amastigotas de *L. (V.) guyanensis*, verificou-se que o Pd (2) no período de 24 horas nas concentrações 0,06 e 0,03 mM induziram a redução de 20% na taxa de infecção e em Pd (3) resultado semelhante é observado em 24 horas nas concentrações 0,015 e 0,0075 mM e em 72 horas em todas as concentrações (Figura 25B).

Na avaliação individual dos ligantes AE e PS, a taxa de infectividade foi superior a 50%, sendo observado um aumento gradativo no decorrer do tempo, sugerindo a não atividade em formas amastigotas.

Devido à precipitação do Pd (1), não foi possível determinar a taxa de infectividade para nenhuma das espécies testadas.

Figura 25 – Taxa de infectividade de macrófagos peritoneais murinos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (A) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (B). Controle negativo (macrófagos não tratados), Glucantime® (33 mM), Pd(2) e Pd(3) (0,06, 0,03, 0,015 e 0,0075 mM), ibandronato de sódio e prodonato de sódio (0,06 mM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.



DISCUSSÕES

Atualmente, existe um incentivo na busca por novos princípios ativos para o tratamento da leishmaniose tegumentar, assim, levando em consideração os relatos na literatura sobre a atividade antileishmania de complexos de paládio(II), nesse estudo a atividade antileishmania de três complexos de paládio(II) foi avaliada contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*; foi avaliado também a citotoxicidade dos complexos em macrófagos peritoneais murinos. O Glucantime® foi utilizado como droga padrão, constituindo assim o controle positivo.

Utilizando como base a classificação apresentada por Oliveira (2009), os complexos de Pd(II) apresentaram citotoxicidade moderada em macrófagos peritoneais murinos, as taxas de viabilidade celular média foram de 68,14%, 69,66% e 62,15%, para Pd(1), Pd(2) e Pd(3), respectivamente.

A baixa viabilidade celular observada nos complexos pode estar relacionada aos ligantes usados na complexação, visto que a viabilidade celular média observada nos ligantes quando testados individualmente foram de 45,07%, 50,95% e 40,13% para IS, AE e PS, respectivamente; demonstrando que quanto mais tóxico o ligante, mais tóxico o complexo. Velásquez *et al.* (2016) também relatam que os ligantes tiveram influência na citotoxicidade dos complexos. Outra observação a ser feita foi quanto a diminuição da viabilidade celular no decorrer do tempo e uma citotoxicidade superior ao observado no Glucantime[®].

Na literatura o estudo realizado por Almeida (2012) relata que o ácido etidrônico (AE) induziu a redução da viabilidade celular de fibroblastos após um período de 4 horas, resultados este que corrobora com esse estudo, visto que foi observada uma redução da viabilidade celular no decorrer do tempo. Entretanto, em relação ao ibandronato, nos estudos de Magneto *et al.* (1999) e Hanif *et al.* (2020) é relatado que o ibandronato não apresentou citotoxicidade em células MDA-MB-231 (linhagem de carcinoma da mama humano) e Caco-2 (linhagem de adenocarcinoma colorretal humano), respectivamente.

De um modo geral, os resultados obtidos nesse estudo quanto a citotoxicidade dos complexos de Pd(II) não corroboram com os resultados descritos na literatura. Velásquez *et al.* (2016), Velásquez *et al.* (2017) e Franco *et al.* (2013) relatam que os complexos de Pd(II) não apresentaram citotoxicidade em macrófagos, inclusive ressaltam que a citotoxicidade dos tratamentos padrões adotados como controle (Pentamidina e Anfotericina B) foi superior ao dos complexos de Pd(II). Apenas no estudo realizado por Cunha *et al.* (2020) o complexo de Pd(II) testado apresenta citotoxicidade a macrófagos mas ainda assim é inferior ao da Anfotericina B.

Em formas promastigotas os complexos de Pd(II) apresentaram atividade antileishmania ($CI_{50} < 0,0038$ mM) para ambas as espécies testadas em todo o período de incubação, entretanto, observa-se que a atividade foi mais expressiva em *L. (L.) amazonensis*. A atividade nesta última foi superior ao observado no Glucantime[®].

Os resultados obtidos nesse estudo assemelham-se aos resultados obtidos por Cunha *et al.* (2020) que relatou a atividade de um complexo de paládio(II) complexado com ibuprofeno que apresentou CI_{50} de 36,03 μ M em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, entretanto

esse complexo não apresentou maior eficácia que o tratamento padrão utilizado como controle (Anfoterinica B CI_{50} 0,11 μ M).

Em dois estudos independentes Velásquez *et al.* (2016) e Velásquez *et al.* (2017) relatam que complexos ciclopaladados apresentaram atividade leishmanicida contra *L. (L.) amazonensis*, obtendo $CI_{50} < 32,12 \mu$ M e CI_{50} 13,2 μ M, respectivamente, neste último também é relatado a inibição de 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, entretanto, esses complexos não apresentaram eficácia superior aos medicamentos padrões utilizados como controle (Pentamidina CI_{50} 7,62 μ M e Anfotericina B CI_{50} 2,22 μ M).

Outro estudo que relata atividade antileishmania com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* é o estudo de Franco *et al.* (2013), em que um complexo de paládio mostrou potente atividade biológica nas formas promastigota (CI_{50} 2,23 μ g/mL), sendo este mais eficaz que o tratamento com Anfotericina B (CI_{50} 6,95 μ g/mL).

Quando avaliada a atividade dos complexos de Pd(II) em formas amastigotas, observou-se que em ambas as espécies os complexos Pd(2) e Pd(3) reduziram 20% da taxa de infecção, demonstrando, resultados similares ao Glucantime[®]. Esses resultados assemelham-se ao do estudo realizado por Velásquez *et al.* (2017) em que o complexo de Pd(II) avaliado reduziu a taxa de infecção em (comparação ao controle sem tratamento) aproximadamente 15% e com resultados similares a atividade de Pentamidina e Anfotericina B.

Ainda quanto a atividade antileishmania em promastigotas e amastigotas, cabe ressaltar que o ligante ibandronato de sódio apresentou atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, assim, a atividade do complexo Pd(1) contra formas promastigotas pode estar associada ao ligante e não diretamente a complexação. Devido a precipitação ocorrida na solução, não foi possível determinar a atividade do Pd(1) e do ibandronato em formas amastigotas, assim, novos estudos devem ser realizados visando estabelecer a atividade antileishmania desse ligante em específico e do Pd(II) complexado com o mesmo.

CONCLUSÃO

Os complexos de paládio mostraram eficácia na inibição de formas promastigotas, principalmente contra *L. (L.) amazonensis*, porém, não apresentaram a mesma eficácia em formas amastigotas.

Em relação a citotoxicidade, os complexos de Pd(II) apresentaram citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos superior quando comparados ao Glucantime[®], assim, os complexos de Pd(II) testados nesse estudo não apresentam melhor eficácia quando comparado ao Glucantime[®].

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Prof. Dr. V.I. Pehnyo do Instituto de Química Geral e Inorgânica, V.I. Vernadskii, Kyiv, Ucrânia por ceder os ligantes ácidos fosfônicos e a metodologia da síntese dos complexos de paládio e ao Programa Europeu Horizon 2020 MSCA-RISE-2016 –VAHVISTUS.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B. V. N. **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos quelantes HEBP e EDTA em fibroblastos de ligamento periodontal humano.** 2012. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2012. Disponível em: <https://posodontoufpa.files.wordpress.com/2012/09/tc3adtulo-avaliac3a7c3a3o-in-vitro-da-citotoxicidade-dos-quelantes-hebp-e-edta-em-fibroblastos-de-ligamento-periodontal-humano.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2021.

CHAGAS, A. F. S.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; SOLDERA, P F.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; NAIFF, M. F.; FRANCO, A. M. R. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity of copper(I) complexes. **Acta Brasiliensis**, v.5, n. 1, p. 1-6. 2021. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/474/115>. Acesso em: 12 jun. 2021.

CUNHA, L. C.; LAGE, D. P.; FERREIRA, L. S.; MATILDE, L. S. V.; COELHO, E. A. F.; BELO, V. S.; TEXEIRA-NETO, R. G.; SOARES, L. F.; CHAGAS, R. C. R.; SILVA, E. S. Leishmanicidal activity of ibuprofen and its complexes with Ni(II), Mn(II) and Pd(II). **Inorganic Chemistry Communications**, v. 113, p. 107756. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1387700319303508>. Acesso em: 1 out. 2020.

FILHO, R. A. S.; OLIVEIRA, D. R.; DUTRA, V. B. P.; MEIRELES, N. M.; ANJOS, L.; MOURA, G. M. R. Tratamento das lesões causadas pela leishmaniose tegumentar. **Revista Liberum Aecessum**, v. 3, n. 1, p. 29-36. 2020. Disponível em: <http://revista.liberumacesum.com.br/index.php/RLA/article/view/47/42>. Acesso em: 13 jun. 2021.

FRANCO, L. P.; DE GÓIS, E. P.; CODONHO, B. S.; PAVAN, A. L. R.; DE OLIVEIRA PEREIRA, I.; MARQUES, M. J.; DE ALMEIDA, E. T. Palladium(II) imine ligands cyclometallated complexes with a potential leishmanicidal activity on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 3, p. 1049–1056. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00044-012-0095-x>. Acesso em: 1 out. 2020.

HANIF, M.; SHAH, S.; RASUL, A.; ABBAS, G.; ZAMAN, M.; AMJAD, M. W.; RAJA, M. A. G.; KHAN, H. U.; ASHFAQ, M.; IQBAL, O. Enhancement of oral bioavailability of ibandronate through gastroretentive raft forming drug delivery system: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 4847-48-58. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7367921/#>. Acesso em: 14 jun. 2021.

ISLAM, A.; SILVA, D. G. J.; BERBET, M. F.; SILVA, D. M. S.; RODRIGUES, L. B.; BERALDO, L.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Novel triphenylantimony(V) and triphenylbismuth(V) complexes with benzoic acid derivatives: structural characterization, *in vitro* antileishmanial and antibacterial activities and cytotoxicity against macrophages, **Molecules**, v. 19, p. 6009–6030. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824136/>. Acesso em: 1 out. 2020.

KHAN, M. R.; ZAIB, S.; KHAN, A.; BADSHAH, A.; RAUF, M. K.; IMTIAZ-UD-DIN; TAHIR, M. N.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Pd(II)-based heteroleptic complexes with N-(acyl)-N', N'-(disubstituted)thioureas and phosphine ligands: Synthesis, characterization and cytotoxic studies against lung squamous, breast adenocarcinoma and *Leishmania tropica*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 479, p. 189–196. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020169317319072>. Acesso em: 1 out. 2020.

MAGNETO, S.; BOISSIER, S.; DELMAS, P. D.; CLEZARDIN, P. Additive antitumor activities of taxoids in combination with the bisphosphonate ibandronate against invasion and adhesion of human breast carcinoma cells to bone. **International Journal of Cancer**, v. 83, p. 263-269. 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291097-0215%2819991008%2983%3A2%3C263%3A%3AAID-IJC19%3E3.0.CO%3B2-T>. Acesso em: 14 jun. 2021.

NASCIMENTO, N. R. F.; DE AGUIAR, F. L. N.; SANTOS, C. F.; LUNA COSTA, A. M.; DE JESUS HARDOIM, D.; DA SILVA CALABRESE, K.; GADELHA ROCHA, M. F. *In*

vitro and *in vivo* leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 196, p. 61–65. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18307381>. Acesso em: 11 mar. 2020.

OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1534/1/417400.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021

PATRA, S. C.; ROY, A. S.; BANERJEE, S.; BANERJEE, A.; DAS SAHA, K.; BHADRA, R.; PRAMANIK, K.; GHOSH, P. Palladium(II) and platinum(II) complexes of glyoxalbis(N-aryl)osazone: molecular and electronic structures, anti-microbial activities and DNA-binding study. **New Journal of Chemistry**, v. 43, p. 9891–9901. 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/nj/c9nj00223e#!divAbstract>. Acesso em: 1 out. 2020.

PINTO, M. O. K. M.; OLIVEIRA, T. M.; AGUIAR, A. N. A.; PINTO, P. E. M.; BARBOSA, D. S.; DINIZ, S. A.; SILVA, M. X. Profile of American tegumentary leishmaniasis in transmission areas in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2007 to 2017. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, p. 1-9. 2020. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12879-020-4860-z.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2021.

VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A. DE; PASSALACQUA, T. G.; RIBEIRO, A. R.; SCONTRI, M.; CHIN, C. M.; ALMEIDA, L.; CISTIA, M. L. D.; ROSA, J. A.; MAURO, A. E.; GRAMINHA, M. A. S. Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1032–1039. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbchs/v27n6/0103-5053-jbchs-27-06-1032.pdf>. Acesso em: 1 out. 2020.

VELÁSQUEZ, A. M. A.; RIBEIRO, W. C.; VENN, V.; CASTELLI, S.; CAMARGO, M. S.; ASSIS, R. P.; SOUZA, R. A.; RIBEIRO, A. R.; PASSALACQUA, T. G.; ROSA, J. A.; BAVIERA, A. M.; MAURO, A. E.; DESIDERI, A.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; GRAMINHA, M. A. S. Efficacy of a binuclear cyclopalladated compound therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis* and its inhibitory effect on topoisomerase 1B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e00688-17. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28507113/>. Acesso em: 2 jun. 2021.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 23 jun. 2020.

Capítulo 3

Utilização de nanopartículas de tântalo no tratamento experimental da leishmaniose cutânea

Submetido a *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* em 04/07/2021

Capítulo 3

Utilização de nanopartículas de tântalo no tratamento experimental da leishmaniose cutânea

Ana Flávia da Silva Chagas^{1,2}, Anny Maíza Vargas Brasil^{1,2}, Breno de Souza Mota¹, Andriy Grafov³, Antonia Maria Ramos Franco¹.

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³Departamento de Química, Universidade de Helsinque - Helsinque, Finlândia.

*Autor correspondente: chagas.afs@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada que apresenta diferentes manifestações clínicas, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Atualmente, o tratamento preconizado apresenta alta toxicidade, eficácia limitada, de longa duração e doloroso, de alto custo e apresenta resistência parasitária acumulada contra essas drogas. O desenvolvimento de nanoformulações pode possibilitar uma maior eficácia no tratamento da doença, reduzindo a toxicidade e ao mesmo tempo elevando a ação farmacológica. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi de sintetizar e avaliar a atividade antileishmaniana *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de tântalo (NPsTa). Para isso, promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram expostas as NPsTa e a eficácia foi determinada pela viabilidade parasitária e taxa de infectividade, respectivamente. A citotoxicidade foi determinada pelo método colorimétrico com um indicador redox, a resazurina. Nos testes *in vivo*, camundongos foram infectados com *L. (V.) braziliensis* e as lesões foram tratadas com NPsTa por via intralesional, cuja eficácia foi avaliada pelo volume da pata dos animais de experimentação e pela carga parasitária. O tamanho médio das NPsTa obtidas foi de ~ 4,07 nm e a magnitude do potencial ζ foi de ~ 27 mV. Nos ensaios *in vitro* as NPsTa não apresentaram citotoxicidade e induziram a inibição parasitária, com eficácia similar ao Glucantime[®]. Nos testes *in vivo* os dados do tratamento demonstraram que as NPsTa induziram um aumento significativo no volume da pata dos camundongos BALB/c, com ação inflamatória exacerbada e não houve cura parasitológica. Diante dos resultados obtidos, ficou evidente que as NPsTa apresentaram atividade significativa nos ensaios *in vitro*, sem evidências positivas quanto a sua eficácia terapêutica nos ensaios *in vivo* preconizados.

Palavras-chave: nanopartículas metálicas, elementos de transição, atividade antileishmania.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença endêmica, presente em 92 países e apresenta manifestações clínicas diversificadas, sendo causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania* (MARTINS *et al.*, 2014; WHO, 2021).

Atualmente as principais drogas do tratamento da LT são Antimoniato de Meglumina, Isetionato de Pentamidina, Anfotericina B e Anfotericina B Lipossomal (BRASIL, 2017). Entretanto, esses medicamentos apresentam alta toxicidade, tratamento longo e doloroso, alto custo financeiro e resistência parasitária; portanto, justifica-se a busca por novos princípios ativos que possam atuar de forma eficaz (BASTOS *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de fármacos em nanoescala vem ganhando espaço e nanopartículas (NPs) são os principais componentes, sendo idealizadas para o sistema de liberação direcionada do princípio ativo em um sítio alvo, visando o aumento da eficácia do fármaco e diminuindo a toxicidade ao organismo (BOISSEAU; LOUBATON, 2011). As NPs metálicas estão atraindo o interesse devido à sua atividade antibacteriana, mas vários estudos mostraram atividade significativa de NPs metálicas contra vírus, fungos e parasitas (DELLA PEPA *et al.*, 2017).

O tântalo (Ta), por sua vez, é um metal que possui uma aplicabilidade variada, independentemente do seu estado físico, seja como metal puro, óxido ou em ligas (SOUSA *et al.*, 2013). Quanto à aplicação biomédica, o Ta tem sido relatado como um dos principais componentes em implantes e próteses, dada sua resistência e baixa capacidade de rejeição (CHELLAN; SADLER, 2015); outros relatos incluem a aplicabilidade antitumoral e parasitária (JIN *et al.*, 2015; DOMINGOS, 2018).

Na busca por melhores agentes leishmanicidas, a nanotecnologia vem ganhando interesse no desenvolvimento de diversos tipos de materiais em nanoescala, atingindo atenção na área da saúde. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania de nanopartículas de tântalo *in vitro* e *in vivo*, utilizando a espécie *L. (V.) braziliensis*.

METODOLOGIA

Síntese e caracterização das nanopartículas de tântalo (NPsTa)

Em um Becker de 100 mL foram adicionados 7 mL de ácido clorídrico (CAS: 7647-01-0, Merck) e 1,6 mL de etóxido de tântalo(V) (CAS: 6074-84-6, Strem Chemicals) a uma temperatura ≤ 50 °C, em agitação constante. Após a homogeneização, foram adicionados 7 mL de polietilenoglicol, 84,4 mL de água destilada e N-metil-glucosamina na proporção 1:10 Ta/NMGA, então a solução foi dialisada por uma hora usando tubo de membrana de celulose (Sigma-Aldrich Co., produto nº D9777) e por fim a solução foi armazenado em frascos de vidro esterilizados.

A caracterização do tamanho de partícula e do potencial zeta das NPs-Ta foi realizada por Difusão Dinâmica de Luz (DDL) no Zetasizer Nano (*Malvern Instruments*) em cubetas de poliestireno apropriadas.

Parasitas

A cepa utilizada neste estudo foi a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/2904), obtida por meio de cultivo em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino Inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brasil), incubado a 25 °C e mantido no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional da Amazônia Pesquisa, INPA, Manaus, Brasil.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em placas de 96 poços (10^5 células/mL) em meio RPMI completo, em uma incubadora contendo 5% de CO₂ (Incubadora de CO₂ do *Form Series II Water Jacket, Thermo Scientific*, EUA) a 37 °C, por 24 h. As células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs-Ta e Glucantime® (3, 1,5, 0,75, 0,38 e 0,19 µM) e NMGA (30, 15, 7,5, 3,8, 1,9 µM). Foram adotados como controle poços sem células e poços com células sem tratamento. A viabilidade celular foi avaliada com sal de resazurina sódica (Sigma Aldrich™, EUA) durante os períodos de 24, 48 e 72 h com a adição de 10 µL de solução estoque de sal de resazurina sódica (4 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato) em cada poço; as placas foram incubadas novamente por mais 12 h a

37 °C. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Elx800™, BIO-TEK®, EUA) no comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram normalizados de acordo com Nascimento *et al.* (2019).

Ensaio com formas promastigotas *in vitro*

As formas promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços (2×10^6 promastigotas/mL) em meio RPMI completo e tratados por um período de 24, 48 e 72 h com as mesmas concentrações de NPsTa, Glucantime® e NMGA usadas em ensaios de citotoxicidade. Poços com promastigotas não tratados foram mantidos como controle. A atividade biológica foi determinada pela quantificação de promastigotas viáveis em hemocitômetro, em microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon, Japão) com aumento de 400x. Os dados foram expressos como metade da concentração inibitória máxima (CI₅₀) (CHAGAS *et al.*, 2021).

Ensaio com formas amastigotas *in vitro*

A avaliação da atividade antileishmania *in vitro* do NPsTa em amastigotas foi realizada conforme descrito por Nascimento *et al.* (2019), com algumas adaptações. Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em uma proporção de 10:1 (10^6 parasitas: 10^5 células/mL) em lamínulas de vidro inseridas em placas de 24 poços contendo meio de cultura RPMI completo, que foi subsequentemente colocado em uma incubadora a 37 ° C e 5% de CO₂ por até 2 h. Após este tempo, as células infectadas foram tratadas com NPsTa e Glucantime® (3, 1,5, 0,75, 0,38 µM) e NMGA (30, 15, 7,5, 3,8 µM) por 24, 48 e 72 h a 37 ° C e 5% de CO₂. Poços com células infectadas e não tratadas foram utilizados como controle. Em seguida, as lamínulas foram fixadas e coradas a cada 24 horas pelo método Panótico Rápido (Laborclin®, Brasil) e analisadas em microscopia óptica. A porcentagem de células infectadas foi determinada pela contagem aleatória de 100 células infectadas e não infectadas em cada lâmina.

Ensaio biológico *in vivo*

Camundongos BALB/c machos adultos (*Mus musculus*) foram selecionados como modelo biológico e mantidos em condições livres de patógenos no Biotério Central do INPA. Os camundongos foram inoculados com 10^6 promastigotas/mL de *L. (V.) braziliensis* em fase estacionária no dorso da pata traseira direita.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, contendo seis animais por grupo, sendo eles: I - grupo controle (+) não infectado e não tratado; II - grupo controle (-) grupo infectado e não tratado; III - grupo Glucantime[®] infectado e tratado com 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia por via intralesional; IV - grupo placebo infectado e tratado e V - grupo NPsTa infectado e tratado com 3 µM/dia por via intralesional. Os grupos foram tratados uma vez por dia, com intervalos de 72 horas, durante 15 dias, resultando em um total de cinco aplicações.

Avaliação do tratamento experimental *in vivo*

Para avaliação do tratamento foi realizada a aferição do volume da pata (comprimento, largura e altura) com a utilização de paquímetro digital (mtx[®]); para avaliação morfológica macroscópica foi realizado o registro fotográfico e para avaliação do peso corporal os animais foram pesados em balança analítica (AY220, Marte, Shimadzu, Brasil) (FRANCO *et al.*, 2016).

Avaliação parasitológica

Após a realização da eutanásia, amostras de tecido seccionado do local inoculado de cada animal foram utilizadas para impressão por aposição em lâminas. Estas foram fixadas e coradas pelo método Panótico Rápido e analisadas em microscopia óptica. A porcentagem de amastigotas, macrófagos infectados e não infectados foi determinada pela contagem aleatória de vinte e cinco campos em cada lamínula (FRANCO *et al.*, 2016).

Fragmentos de tecido de pele do local inoculado e do fígado foram excisados assepticamente e cultivados em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle, 1908) por até 20 dias a 25 °C. Foi considerado positivo para leishmaniose quando pelo menos uma forma viável do parasita foi reisolada no meio de cultura (FRANCO *et al.*, 2016).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Usando regressão linear, o número de células vivas foi usado para calcular o valor de CI_{50} . O teste estatístico ANOVA de uma via foi usado para avaliar a significância das diferenças entre os vários grupos, seguido pelo teste de Tukey para comparar as médias das diferenças entre os tratamentos, com 95% de confiança a ser considerado significativo.

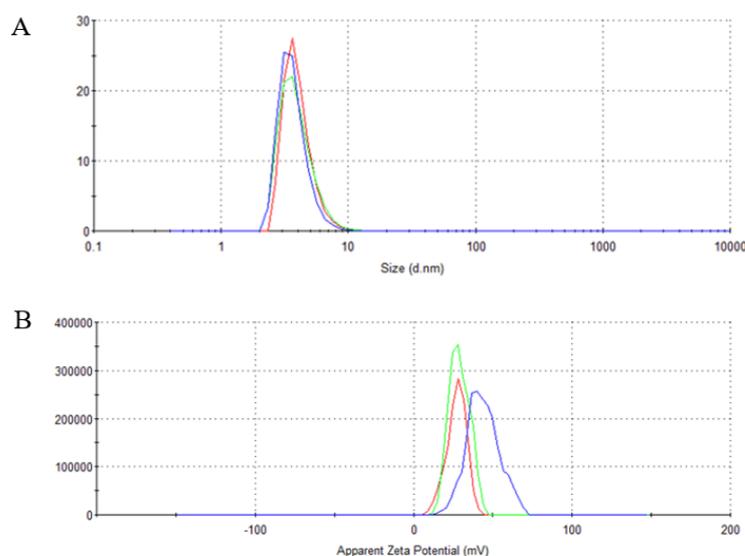
Ética

Para os testes *in vitro*, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA/INPA: 023/2020 - 01280.000455/2020-41). Para os testes *in vivo*, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (aprovação CEUA/INPA: 059/2018 - 01280.001884/2018-11).

RESULTADOS

Preliminarmente foram obtidas nanopartículas de tântalo (NPsTa) ativas e estáveis para uso no tratamento da leishmaniose cutânea experimental. O tamanho médio das NPsTa obtidas foi de ~ 4,07 nm (Figura 26A) e a magnitude do potencial ζ foi de ~ 27 mV (Figura 26B).

Figura 26 - Caracterização de NPsTa quanto a distribuição do tamanho da partícula (A) e potencial ζ (B).



Em testes biológicos com formas promastigotas, observou-se que as NPsTa apresentaram $CI_{50} < 3 \mu\text{M}$ durante todo o período de incubação, representando um valor inferior a concentração testada neste estudo, enquanto que Glucantime[®] e NMGA apresentaram $CI_{50} > 0.43$ e $> 21.7 \mu\text{M}$, respectivamente. Em formas amastigotas as NPsTa apresentaram $CI_{50} < 4.71 \mu\text{M}$ e o Glucantime[®] e NMGA apresentaram $CI_{50} > 4.39$ e $60.3 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 11).

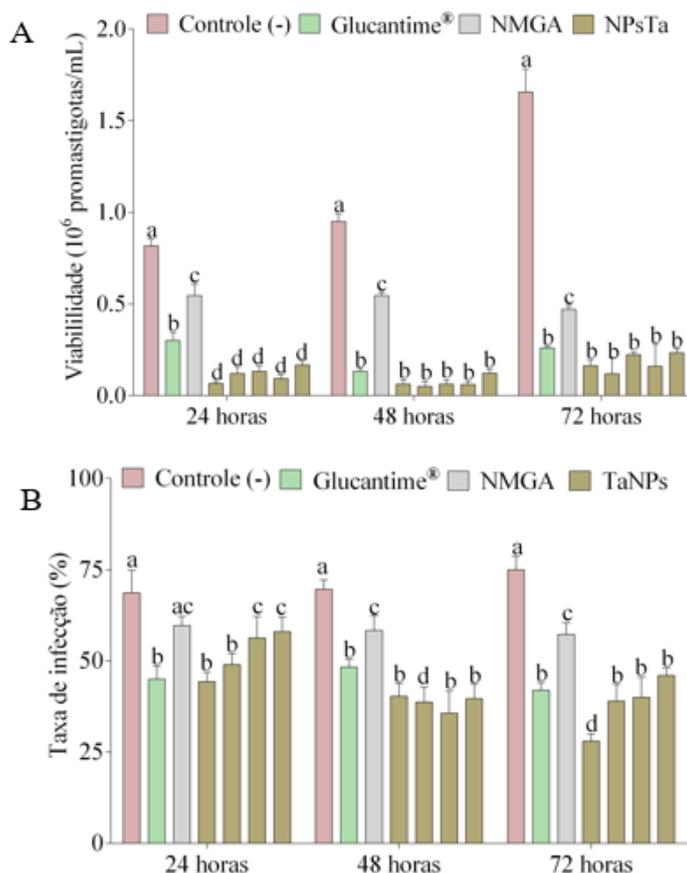
Tabela 11 - Atividade antileishmania *in vitro* das NPsTa em formas promastigotas e amastigotas.

Substâncias	Promastigotas CI_{50} (μM)		
	24 h	48 h	72 h
NPsTa	< 3	< 3	< 3
Glucantime [®]	$2,1 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,03$
NMGA	$46,4 \pm 0,03$	$26,1 \pm 0,03$	$21,7 \pm 0,06$
Substâncias	Amastigotas CI_{50} (μM)		
	24 h	48 h	72 h
NPsTa	$4,7 \pm 2$	$4 \pm 2,8$	$1,5 \pm 1,6$
Glucantime [®]	$4,3 \pm 2,3$	$8,4 \pm 2,3$	$5,3 \pm 3,4$
NMGA	$98,7 \pm 2,5$	$88,19 \pm 2,1$	$60,32 \pm 2$

Observa-se que as NPsTa inibiram 50% das formas promastigotas quando comparado aos grupos controle negativo e NMGA ($p < 0,05$) em todo o período de incubação, e apresentou atividade similar ao Glucantime[®] ($p > 0,05$) (Figura 27A).

Em formas amastigotas percebe-se que somente a concentração de 3 μM das NPsTa em 72 horas inibiu mais de 50% das formas amastigotas, entretanto nas demais concentrações observa-se uma viabilidade parasitária inferior ao controle negativo ($p < 0,05$) e similaridade com a atividade de Glucantime[®] ($p > 0,05$). Além disso, é perceptível que na concentração de 3 μM de NPsTa ocorreu uma leve redução da taxa de infecção (Figura 27B).

Figura 27 - Viabilidade parasitária de formas promastigotas (A) e taxa de infecção (B) de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Controle (-) sem tratamento, Glucantime[®] (3 $\mu\text{M}/\text{mL}$); NMGA (30 $\mu\text{M}/\text{mL}$) e NPsTa (3 a 0,19 $\mu\text{M}/\text{mL}$). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).



A avaliação da citotoxicidade *in vitro* demonstrou que as NPsTa não apresentaram toxicidade para macrófagos peritoneais murinos, com uma média de viabilidade celular superior a 94%, enquanto que em Glucantime[®] e NMGA a viabilidade celular foi acima de 84% e 94%, respectivamente.

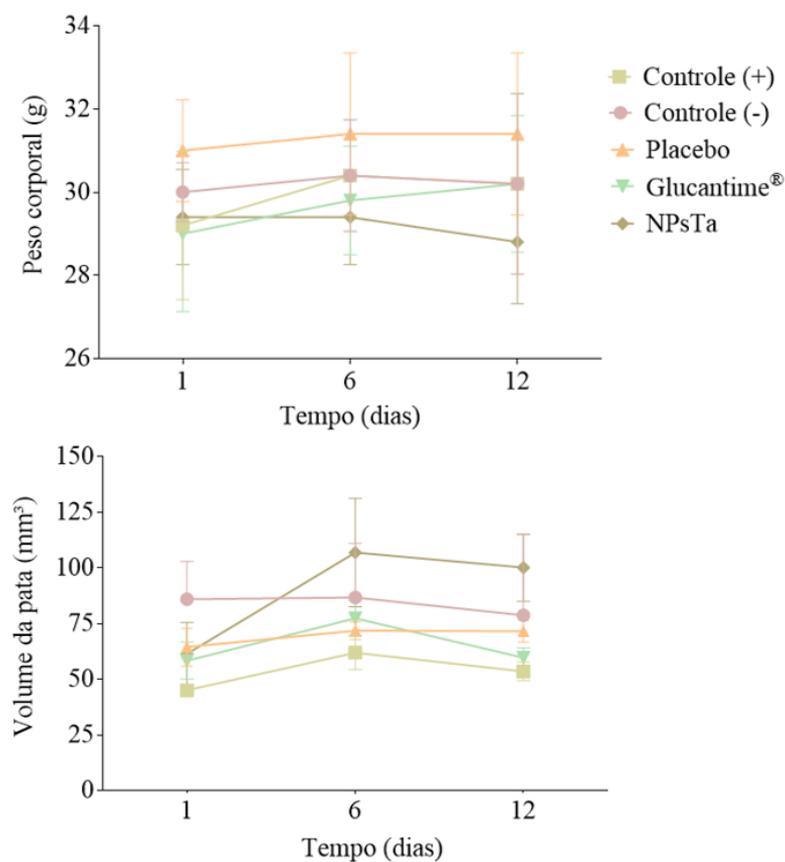
Outras informações relevantes quanto aos ensaios biológicos *in vitro* (promastigota, amastigota e citotóxico) são referentes à observação de turbidez na solução de NPsTa após a incubação na presença do meio líquido RPMI.

No teste biológico *in vivo* a formação do nódulo dérmico ocorreu dois meses após a inoculação das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e o tratamento foi realizado durante o período de 15 dias. Durante esse período os grupos de tratamento não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quanto ao peso (Figura 28A).

A aferição da pata com paquímetro digital demonstrou que a substância mais eficaz em reduzir o volume da pata foi o Glucantime[®] que apresentou redução de 25% em relação ao controle (-), enquanto o grupo tratado com NPsTa apresentou maior volume na pata, com aumento de 28% em relação ao controle (-). Verificou-se que no grupo tratado com NPsTa a pata dos animais não retornava ao volume e ao estado fisiológico, mesmo após 72 horas de tratamento, caracterizando sinal flogístico de tumor.

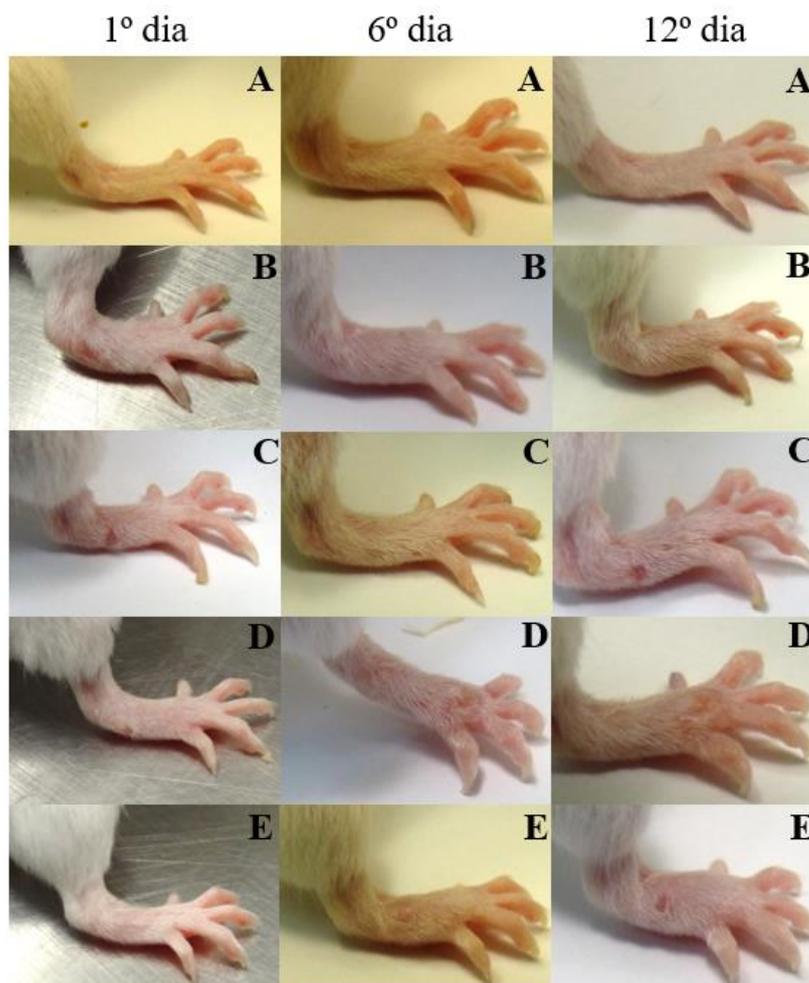
A partir do sexto dia de tratamento, os animais tratados com NPsTa apresentaram maior volume da pata com diferença significativa para o controle positivo ($p < 0,005$), placebo ($p < 0,001$) e Glucantime[®] (Tukey, $p < 0,005$) (Figura 28B)

Figura 28 - Peso corporal (A) e evolução clínica do volume das patas (B) de *Mus musculus* BALB/c. Controle (+) camundongos não infectados; controle (-) infectados e não tratados; placebo; Glucantime® (infectados e tratados com 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia) e NPsTa (infectados e tratados com 3 μM).



Por meio da avaliação clínica macroscópica dos nódulos dérmicos durante o tratamento, foi possível constatar crescente edema na pata dos camundongos em todos os grupos infectados, além disso, é possível observar macroscopicamente que o grupo de NPsTA apresenta maior volume de pata (Figura 29).

Figura 29 - Aspecto clínico morfológico macroscópico de nódulos dérmicos em *Mus musculus* BALB/c, infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* durante o tratamento (intervalos de 72h). Controle (+) camundongos não infectados (A); controle (-) infectados e não tratados (B), placebo (C), Glucantime[®] (infectados e tratados com 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia) (D) e NPsTa (infectados e tratados com 3 μM) (E).

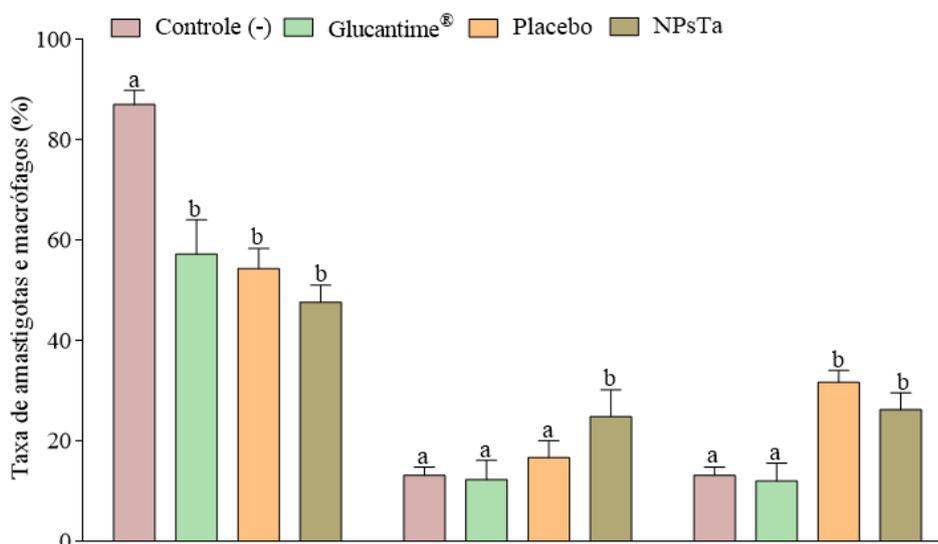


O diagnóstico parasitológico por método direto evidenciou a presença de formas promastigotas em todos os grupos de experimentação infectados, além disso, no diagnóstico feito pelo método de aposição em lâminas dos fragmentos de tecido (pata) dos animais demonstrou a presença de formas amastigotas em todos os grupos de experimentação infectados.

Na quantificação de amastigotas, macrófagos infectados e não infectados, verificou-se que nos grupos tratados com Glucantime[®], placebo e NPsTa houve menor quantidade de amastigotas ($p < 0,001$) e a menor quantidade de amastigotas é observada em NPsTa. Em

relação a taxa de macrófagos infectados, percebe-se que há diferença das NPsTa em relação ao demais grupos ($p < 0,05$), apresentando maior taxa de macrófagos infectados e, em macrófagos não infectados, a maior taxa foi observada nos grupos placebo e NPsTa ($p < 0,001$) (Figura 30).

Figura 30 - Taxa de amastigotas, macrófagos infectados e não infectados de fragmentos do dorso da pata de *Mus Musculus* infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Controle negativo (barras pretas), tratados com 20 mg/Sb⁵⁺/kg/dia de Glucantime[®] (barras cinzas claro), Placebo (barras pontilhadas) e 3 μ M de NPsTa (barras cinzas escuro). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras.



DISCUSSÃO

Nanopartículas metálicas ou de óxido podem apresentar propriedades diferenciais, ou seja, forma isolada, agregada ou dissolvida e essas transições podem ocorrer no processo de síntese, devido à natureza da superfície das nanopartículas e às condições ambientais (pH, força iônica, presença de matéria orgânica, entre outros) (STEBOUNOVA; GUIO; GRASSIAN, 2011).

A caracterização das propriedades físicas e químicas dos nanomateriais é essencial para a compreensão do comportamento das NPs em diferentes condições. A análise do potencial Zeta é uma técnica que permite determinar a carga superficial dos NPs em solução, este é um preditor de estabilidade coloidal e os valores geralmente variam de +100 mV a -100

mV, comumente NPs que possuem potencial Zeta acima de 30 mV ou menos de - 30 mV tem um alto grau de estabilidade, valores menores que 20 mV fornecem apenas estabilidade de curto prazo e -5 mV a +5 mV indicam agregação rápida (HONARY; ZAHIR, 2013).

Nos testes *in vitro*, foi observado a turvação da solução de NPs-Ta quando são adicionados ao meio de cultura de células após 24 horas, sugerindo a ocorrência de hidrólise e possível inativação de NPs-Ta. Além disso, a caracterização de NPs-Ta mostrou um potencial zeta na magnitude de 27 mV, sugerindo uma possível estabilidade de curto prazo e formação de agregados.

A nanotecnologia tem se destacado nas pesquisas para o tratamento da leishmaniose, pois fornece diferentes abordagens para a liberação, absorção, distribuição e excreção do fármaco, além de permitir melhor solubilidade, maior permeabilidade e menor toxicidade (MARQUES *et al.*, 2019).

Em um estudo recente de De Souza *et al.* (2019) observou-se que a nanotecnologia tem sido amplamente utilizada em estudos para leishmaniose cutânea e mucocutânea, além disso, entre as nanoestruturas, as nanopartículas metálicas são as mais utilizadas em estudos para leishmaniose cutânea, enquanto lipídios e nanopartículas poliméricas são os mais testados para leishmaniose visceral.

Embora as nanopartículas metálicas estejam sendo amplamente utilizadas em pesquisas para o tratamento da leishmaniose, atualmente, apenas o estudo de Domingos (2018) apresenta dados de nanomatrizes inorgânicas bioativas à base de óxidos de tântalo (NIB-Ta) para tratamento experimental *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose cutânea.

No estudo de Domingos (2018), o NIB-Ta foi avaliado quanto à atividade antileishmania em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, e os dados demonstraram que o NIB-Ta inibiu o crescimento das formas promastigotas apresentando atividade semelhante ao Glucantime[®] e houve menor taxa de infecção de macrófagos murinos por amastigotas quando estes foram tratados com NIB-Ta.

Os dados apresentados por Domingos (2018) corroboram com o observado neste estudo, pois foi possível verificar menor viabilidade das formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* quando expostas a nanopartículas de tântalo quando comparado ao controle sem tratamento e atividade similar ao observado em Glucantime[®]. Em relação à avaliação citotóxica, este estudo também corrobora o apresentado por Domingos (2018), pois as nanopartículas de tântalo nos dois estudos não apresentaram citotoxicidade *in vitro* em macrófagos peritoneais murinos.

As propriedades químicas do Ta valorizam e até justificam o bom relacionamento com os fluidos corporais, devido à sua inércia química, por isso este elemento tem sido utilizado na fabricação de próteses dentárias e ortopédicas (SOUSA *et al.*, 2013). Porém, neste estudo foi perceptível que durante o tratamento experimental da leishmaniose tegumentar em modelos animais (*Mus musculus*), as NPs-Ta quando aplicadas por via subcutânea possivelmente induziram uma ação inflamatória na pata dos animais, piorando a manifestação clínica da doença.

Resultado semelhante foi relatado na pesquisa de Domingos (2018), que descreve principalmente a ação pró-inflamatória no tecido lesado em *Mesocricetus auratus* infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Quanto ao diagnóstico parasitológico, tanto neste estudo como no estudo de Domingos (2018) foi observada a presença de formas amastigotas, determinando a ausência de atividade leishmanicida *in vivo*.

CONCLUSÕES

É possível inferir que as nanopartículas de tântalo sintetizadas e avaliadas nesse estudo, não apresentaram citotoxicidade *in vitro* e demonstraram atividade antileishmania *in vitro*. Entretanto, diante dos resultados obtidos *in vivo*, ficou evidente que a aplicação intralesional das nanopartículas de tântalo sintetizadas nesse estudo, não promove a cura da leishmaniose tegumentar causada pela espécie de *Leishmania* utilizada, além disso, sugere-se que as NPs-Ta induzem uma ação inflamatória exacerbada no local da aplicação, já comprovada em estudos anteriores na literatura.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Programa Europeu Horizon 2020 MSCA-RISE-2016 –VAHVISTUS e ao apoio a participação do Brasil pela FAPEAM com o suporte financeiro Horizon 2020.

REFERÊNCIAS

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia antileishmaniana: Uma revisão bibliográfica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 2072-2104. 2016. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v8n6a21.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2021.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine Nanomédecine et nanotechnologies pour la médecine. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 12, n. 7, p. 620-636. 2011. Disponível em: https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/598930/filename/Boisseau_nanomedicine_CRAS.pdf. Acesso em: 16 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde. 2017. 189 p. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 3 mai. 2021.

CHAGAS, A. F. S.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; SOLDERA, P. F.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; NAIFFI, M. F.; FRANCO, A. M. R. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity of copper(I) complexes. **Acta Brasiliensis**, v. 5, n. 1, p. 1-6. 2021. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/474>. Acesso em: 3 mai. 2021.

CHELLAN, P.; SADLER, P. J. The elements of life and medicines. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 373, n. 2037, p. 2014182-2014182. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4342972/>. Acesso em: 16 mai. 2021.

DE SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUJUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LOBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. (1-2), p. 421–431. 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/176438>. Acesso em:

DELLA PEPA, M. E.; MARTORA, F.; FINAMORE, E.; VITIELLO, M.; GALDIERO, M.; FRANCI, G. **Role of Nanoparticles in Treatment of Human Parasites**. In: Rai M., Alves dos Santos C. (eds) *Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology*. Springer, Cham. 2017. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-70299-5_13. Acesso em: 5 abr. 2021.

DOMINGOS, P. R. C. **Avaliação da eficácia de diamidínicos fluorados e nanopartículas metálicas na leishmaniose cutânea**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 2018. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6600>. Acesso em: 3 mai. 2021.

FRANCO, A. M. R.; GRAFOVA, I.; SOARES, F. V.; GENTILE, G.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. C.; BOLSON, M. A, SARGENTINI JR, E.; CARFAGNA, C.; LESKELA, M.; GRAFOV, A. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6771–6780. 2016. Disponível em: <https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=34032>. Acesso em: 3 mar. 2021.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 265-273. 2013. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88556>. Acesso em: 2 mar. 2021.

JIN, Y.; MA, X.; FENG, S.; LIANG, X.; DAI, Z.; TIAN, J.; YUE, X. Hyaluronic Acid Modified Tantalum Oxide Nanoparticles Conjugating Doxorubicin for Targeted Cancer Theranostics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2530-2541. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26554699/>. Acesso em: 1 jan. 2021.

MARQUES, C. S. F.; JÚNIOR, J. B. M.; ANDRADE, L. R. M.; ANDRADE, L. N.; SANTOS, A. L. S.; CRUZ, M. S. P.; CHAUD, M.; FRICKS, A. T.; SEVERINO, P. Use of pharmaceutical nanotechnology for the treatment of leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1-5. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/9nnCTfyfQ5pTjmQQLZRpXqc/?lang=pt>. Acesso em: 16 jun. 2021.

MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; LAURIS, J. R. P.; MARTINS, A. C. G. P. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 98, n. 1, p. 52-58. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/5fyTRBVbB3HDp5m556ZsTDq/?lang=en>. Acesso em: 2 fev. 2021.

NASCIMENTO, N. R. F.; DE AGUIAR, F. L. N.; SANTOS, C. F.; LUNA, A. M. C.; HARDOIM, D. J.; CALABRESE, K. S.; ALMEIDA-SOUZA, F.; SOUSA, E. H. S.; LOPES, L. G. F.; TEXEIRA, M. J.; PEREIRA, V. S.; BRILHANTE, S. R. N.; ROCHA, M. F. G. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 192, p. 61–65. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18307381>. Acesso em: 12 dez. 2021.

NICOLLE, C. Culture du parasite du bouton d'orient. **CR Academic Science**, v. 146, p. 842-843. 1908.

OLIVEIRA, L. F. G.; PEREIRA, B. A. S.; GILBERT, B.; CORRÊA, A. L.; ROCHA, L.; ALVES, C. R. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis

treatment. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, p. 219-233. 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-016-9471-3>. Acesso em: 12 jun. 2021.

SOUSA, R. M. F.; SILVA, T. A. R.; GUERRA, J. C. A. Tântalo: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, v. 24, n. 3, p. 343-346. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273476589_Tantalo_Breve_historico_propiedades_e_aplicacoes. Acesso em: 12 nov. 2021.

STEBOUNOVA, L. V.; GUIO, E.; GRASSIAN, V. H. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 233–244. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-010-0022-3>. Acesso em: 18 jul. 2020.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 1 jan. 2021.

Capítulo 4

Atividade antileishmania *in vitro* de nanopartículas de bismuto

Capítulo 4

Atividade antileishmania *in vitro* de nanopartículas de bismuto

Ana Flávia da Silva Chagas^{1,2*}, Breno de Souza Mota¹, Anny Maíza Vargas Brasil^{1,2}, Antonia Maria Ramos Franco¹, Andriy Grafov³.

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³Departamento de Química, Universidade de Helsinque - Helsinque, Finlândia.

*Autor correspondente: chagas.afs@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que desenvolve diferentes manifestações clínicas no paciente. Atualmente, no Brasil o tratamento de primeira escolha é o antimoniato de meglumina, porém, essa droga apresenta eficácia limitada, assim, faz-se necessário a busca por novos princípios ativos e, neste campo, a nanotecnologia vem ganhando importância, pois pode proporcionar melhor eficácia e menor toxicidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania *in vitro* de nanopartículas de bismuto (NPsBi). Para isto, promastigotas e amastigotas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* foram expostas as NPsBi e a eficácia foi determinada pela viabilidade parasitária e taxa de infecção, e a citotoxicidade foi determinada pelo método colorimétrico com resazurina. O tamanho médio das NPsBi obtidas foi de 17.58 nm e magnitude do potencial ζ foi de -21.9. Nos ensaios biológicos verificou-se que as NPsBi são atóxicas a macrófagos peritoneais murinos (> 90% de viabilidade celular) e apresentaram atividade antileishmania, principalmente, contra *L. (L.) amazonensis*, apresentando com $CI_{50} < 0,05 \mu M$ em promastigotas e $CI_{50} < 0,84 \mu M$ em amastigotas. Assim, indicando que novos estudos devem ser desenvolvidos para averiguar a antileishmania. atividade *in vivo* e os mecanismos de ação dessas NPsBi.

Palavras-chave: leishmaniose, elemento de transição, nanotecnologia.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada e parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitida pela picada de flebotômíneos infectados, podendo causar lesões cutâneas e mucosas em um hospedeiro mamífero (ZIGMUNDO *et al.*, 2020).

Atualmente, as drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose são o antimoniato de meglumina, a anfotericina B, a anfotericina B lipossomal e o isetionato de pentamidina. A escolha do medicamento e sua administração dependerá das manifestações clínicas, da espécie envolvida, da resposta ao tratamento e da disponibilidade dos medicamentos (BRASIL, 2017).

Nesse sentido, percebe-se que ainda existem limitações no esquema terapêutico, devido à baixa eficácia dos medicamentos, alta toxicidade, tratamento longo e doloroso, alto custo financeiro e resistência parasitária. Portanto, justifica-se a busca por novos princípios ativos que possam atuar de forma eficaz no tratamento da doença (BASTOS *et al.*, 2016).

Nesse sentido, o bismuto (Bi) é considerado uma alternativa interessante por ser um metal biologicamente ativo e com baixa toxicidade em células de mamíferos. Recentemente, a pesquisa com Bi busca desenvolver novos agentes de contraste de imagem, compostos bioativos de bismuto, como drogas antiinflamatórias, metalofármacos com atividade antimicrobiana, antitumoral e antileishmania (KEOGAN; GRIFFITH, 2014; KANATZIDIS; SUN; DEHNEN, 2020).

Estudos recentes foram realizados com os complexos Bi(III) e Bi(V) avaliando a atividade antileishmania; Andleeb *et al.* (2019) e Pathak *et al.* (2017) relataram a atividade antileishmania de complexos Bi(V) e Bi(III) contra as espécies *Leishmania tropica* e *Leishmania major*, respectivamente, além disso, ambos os estudos demonstraram a baixa toxicidade em linfócitos e fibroblastos humanos.

Atualmente, os estudos com Bi estão voltados apenas na forma de complexos metálicos, e não foram identificados na literatura estudos que relatem a síntese de nanopartículas de bismuto e avaliação da atividade antileishmania, sendo esse um campo promissor a ser explorado. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a atividade biológica *in vitro* de nanopartículas de bismuto em *Leishmania* spp.

METODOLOGIA

Síntese e caracterização das nanopartículas de bismuto (NPsBi)

As nanopartículas foram sintetizadas e cedidas pelo Prof. Dr. Andriy Grafov; devido a solicitação de sigilo do mesmo, a síntese das NPsBi não será apresentada nesse manuscrito.

A caracterização do tamanho de partícula e do potencial zeta das NPsBi foi realizada por Difusão Dinâmica de Luz (DDL) no Zetasizer Nano (Malvern Instruments) em cubetas de poliestireno apropriadas.

Parasitas

A cepa utilizada nesse estudo foi *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), cultivadas no meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado - BFSi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brasil), incubado a 25 °C.

Ensaio biológico em formas promastigotas

Promastigotas foram cultivados em placas de 96 poços (2×10^6 promastigotas/mL) em RPMI completo e tratadas com diferentes concentrações das NPsBi ou Glucantime® (0,87 a 0,05 µM) ou MES (4,35 a 0,28 µM), com diluição seriada 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32, por 24, 48 e 72 horas. Poços com promastigotas sem tratamento foram mantidos como controle. A atividade biológica foi determinada pela quantificação de promastigotas viáveis em hemocítmetro, por meio de microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão) com aumento de 400x. Os dados foram expressos como metade da concentração inibitória máxima (CI₅₀) (CHAGAS et al, 2021).

Ensaio biológico em formas amastigotas

A avaliação da atividade antileishmania em amastigotas, *in vitro*, das NPsBi foi realizada conforme descrito por Nascimento *et al.* (2019), com algumas adaptações. Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com promastigotas de *Leishmania* spp. na proporção de 10:1 (10^6 parasita: 10^5 células) em lamínulas de vidro em placas de 24 poços

com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFBI e incubados em uma incubadora de 5% de CO₂ a 37 °C por até 2 horas. Após este tempo, as células infectadas foram incubadas sem tratamento (controle negativo) ou contendo diferentes concentrações das NPsBi ou Glucantime[®] (0,87 a 0,10 µM), ou MES (4,35 a 0,56 µM), com diluição seriada 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, por 24, 48 e 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂. Em seguida, as lamínulas foram fixadas e coradas a cada 24 horas pelo método Panótico Rápido (Laborclin[®], Paraná, Brasil) e analisadas por microscopia óptica. A porcentagem de células infectadas foi determinada pela contagem aleatória de 100 células infectadas e não infectadas em cada lamínula.

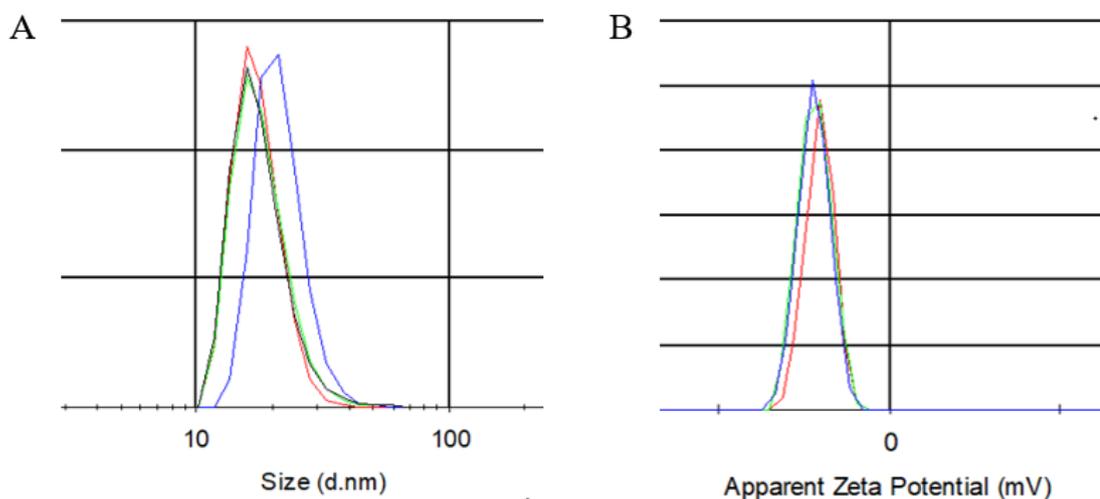
Ensaio biológico de citotoxicidade

Macrófagos peritoneais murinos, foram cultivados em placas de 96 poços (10⁵ células/mL) em meio RPMI completo e incubados em estufa com 5% de CO₂ (Formal Série II Water Jacket CO₂ Incubator, Thermo Scientific, USA) a 37 °C. As células foram tratadas com diferentes concentrações das NPsBi ou Glucantime[®] (0,87 a 0,05 µM) ou MES (4,35 a 0,27 µM), com diluição seriada 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32. Os poços sem células foram mantidos em branco e os poços com células sem tratamento foram mantidos como controle. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando resazurina sal sódico (Sigma Aldrich[™], EUA) no período de 24, 48 e 72 horas com a adição de 10 µL de solução estoque de resazurina sal sódico (4 mg/mL em PBS) em cada poço e as placas foram novamente incubadas por mais 12 horas a 37 °C. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Elx800[™], BIO-TEK[®], Winooski, Vermont, EUA) no comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram normalizados de acordo com Nascimento *et al.* (2019).

RESULTADOS

O tamanho médio das NPsBi obtidas foi de 17,58 ± 4,168 nm (Figura 31A) e a magnitude do potencial ζ foi de - 21,9±4,51 mV (Figura 31B).

Figura 31 - Caracterização de NPsTa quanto a distribuição do tamanho da partícula (A) e potencial ζ (B).



Na avaliação da atividade antileishmania em formas promastigotas, as NPsBi apresentaram melhor eficácia em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com $CI_{50} < 0,05 \mu M$ durante todo o período de incubação. Quando comparado ao Glucantime e MES, observa-se que as NPsBi apresentaram menor concentração inibitória em todo o período de tempo para ambas as espécies testadas (Tabela 12).

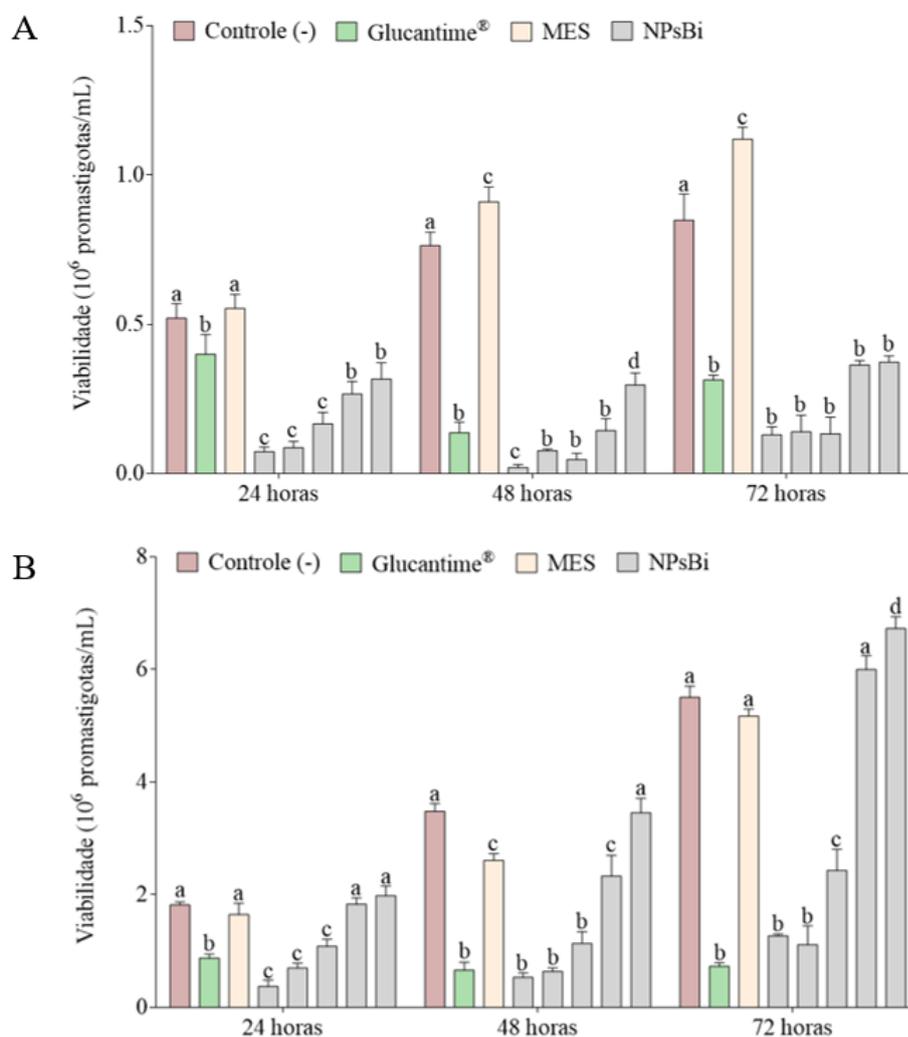
Tabela 12 - Atividade antileishmania *in vitro* das NPsBi, Glucantime[®] e MES em formas promastigotas.

Substâncias	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> CI_{50} (μM)		
	24 h	48 h	72 h
NPsBi	$< 0,05 \pm 0,02$	$< 0,05 \pm 0,02$	$< 0,05 \pm 0,03$
Glucantime [®]	$3,8 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,16$	$12 \pm 0,12$
MES	$15 \pm 0,04$	$17 \pm 0,05$	$32 \pm 0,04$
Substâncias	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> CI_{50} (μM)		
	24 h	48 h	72 h
NPsBi	$0,46 \pm 0,12$	$0,28 \pm 0,19$	$0,43 \pm 0,13$
Glucantime [®]	$3 \pm 0,22$	$1,2 \pm 0,11$	$2,1 \pm 0,42$
MES	$14 \pm 0,10$	$9 \pm 0,09$	$29 \pm 0,14$

Em *L. (L.) amazonensis*, as NPsBi apresentaram melhor eficácia no período de 48 horas, porém, em todo o período de incubação foi observado menor viabilidade parasitária no tratamento com as NPsBi quando comparado ao controle negativo e MES ($p < 0,001$). Quando comparado ao Glucantime[®], observou-se que a concentração 0,87 μM de NPsBi apresentou melhor eficácia na inibição parasitária ($p < 0,05$) (Figura 32A).

Em *L. (V.) guyanensis* observa-se que apenas as concentrações de 0,87 a 0,21 μM do NPsBi induziram redução da viabilidade parasitária ($p < 0,005$) quando comparado ao controle negativo e ao MES. Quando comparada à atividade do Glucantime[®], observa-se que apenas a concentração de 0,87 μM de NPsBi em 24 horas induziu maior redução da viabilidade parasitária ($p < 0,05$) (Figura 32B).

Figura 32 – Viabilidade parasitária de formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (A) e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (B). Controle (-) promastigotas sem tratamento, Glucantime® (0,87 μ M), MES (4,35 μ M) e NPsBi (0,87 a 0,05 μ M). Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).



Na avaliação da atividade antileishmania, observa-se que os resultados são similares aos obtidos em promastigotas, assim as NPsBi apresentaram melhor eficácia contra amastigotas de *L. (L.) amazonensis*; e quando comparado ao Glucantime e MES, observa-se que as NPsBi apresentaram menor concentração inibitória em todo o período de tempo para ambas as espécies testadas (Tabela 12).

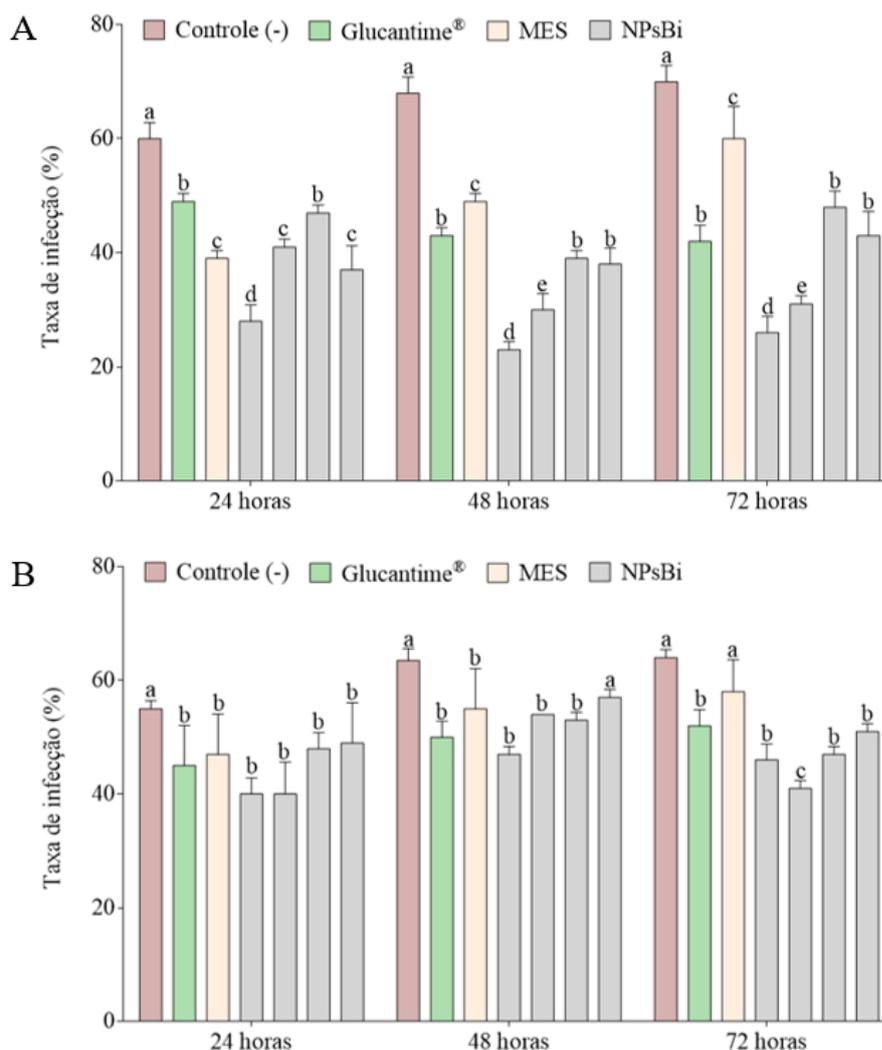
Tabela 13 - Atividade antileishmania *in vitro* das NPsBi, Glucantime[®] e MES em formas amastigotas.

Substâncias	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> CI ₅₀ (μM)		
	24 h	48 h	72 h
NPsBi	0,84 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,42 ± 0,03
Glucantime [®]	4,89 ± 0,02	2,09 ± 0,06	3,08 ± 0,03
MES	1,30 ± 0,02	2,15 ± 0,02	5,29 ± 0,03
Substâncias	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> CI ₅₀ (μM)		
	24 h	48 h	72 h
NPsBi	1,99 ± 0,04	2,30 ± 0,01	3,56 ± 0,02
Glucantime [®]	3,29 ± 0,07	2,37 ± 0,03	5,64 ± 0,02
MES	23,24 ± 0,03	14,19 ± 0,03	5,60 ± 0,02

Nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* observa-se que macrófagos peritoneais murinos apresentaram menor taxa de infectividade quando expostos a NPsBi (< 50%) quando comparados ao controle negativo (> 60%) ($p < 0,001$). Quando comparada à atividade do Glucantime[®] e MES, observa-se que apenas a concentração de 0,87 μM das NPsBi em 48 e 72 horas induziu uma diminuição na taxa de infectividade ($p < 0,001$) (Figura 33A).

Em *L. (V.) guyanensis* observou-se que a menor taxa de infecção em NPsBi (52%) foi em 72 horas quando comparada ao controle negativo (70%) ($p < 0,05$). Enquanto que não houve diferença significativa entre os tratamentos com NPsBi, Glucantime[®] e MES (Figura 33B).

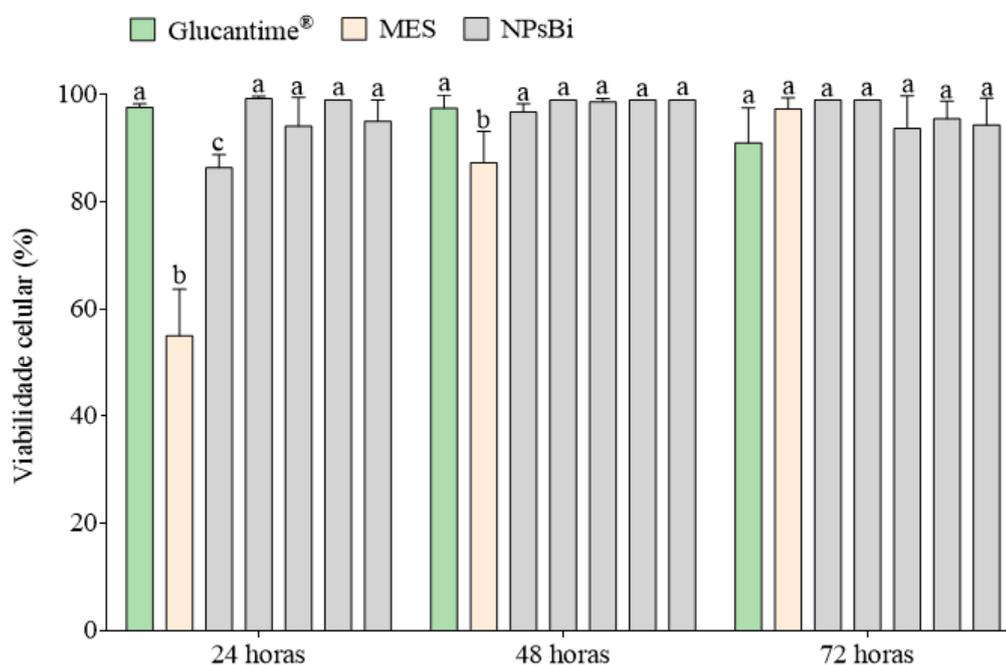
Figura 33 – Taxa de infecção de macrófagos peritoneais murinos por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (A) e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. Controle (-) macrófagos infectados sem tratamento, Glucantime® (0,87 μ M), MES (4,35 μ M) e NPsBi (0,87 a 0,05 μ M). Cada barra representa a média \pm desvio padrão e a diferença significativa ($p < 0,05$) foi indicada por letras diferentes no mesmo período.



A avaliação da citotoxicidade *in vitro* demonstrou que as NPsBi e o Glucantime® não apresentaram toxicidade para macrófagos peritoneais murinos, com uma média de viabilidade celular superior a 90%, enquanto que no MES apresentou citotoxicidade moderada com viabilidade celular superior de 50%.

Figura 34 - Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos tratados com Glucantime® (0,87 μ M), MES (4,35 μ M) e NPsBi (0,87 a 0,05 μ M). Cada barra representa a média \pm desvio

padrão. Letras iguais em colunas diferentes - não significativo. Letras diferentes em colunas diferentes - significativo ($p < 0,05$).



DISCUSSÕES

Os tratamentos disponíveis para a leishmaniose tegumentar têm eficácia limitada, por isso há um incentivo na busca por novos princípios ativos. Assim, levando em consideração as diversas atividades biológicas do bismuto relatadas na literatura e as vantagens do uso da nanotecnologia, esta pesquisa apresenta dados sobre a atividade antileishmania e citotoxicidade de nanopartículas de bismuto.

A caracterização das propriedades das NPsBi demonstrou que as mesmas apresentaram dimensões de 17.58 ± 4.168 nm, estando essa dentro do intervalo de um a 100 nm, podendo assim ser classificada como nanopartículas; e magnitude do potencial ζ de -21.9 ± 4.51 mV, segundo Honary e Zahir (2013) esse valor de potencial ζ indica uma estabilidade de curto prazo.

Quanto a atividade biológica, observou-se que as NPsBi apresentaram melhor eficácia nas formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis*, com $CI_{50} < 0,46$ μ M em promastigota e taxa de infecção $< 50\%$.

Até o nosso conhecimento, não há na literatura a descrição da atividade antileishmania de nanopartículas de bismuto. As pesquisas com bismuto concentram-se na utilização de complexos metálicos, nesse sentido, Islam *et al.* (2014) e Lizarazo-Jaimes *et al.* (2012)

relataram que complexos de Bi(V) e (III) apresentaram $CI_{50} < 8,5 \mu\text{M}$ e $1,07 \mu\text{M}$ nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Nos estudos de Andleeb *et al.* (2019) e Pathak *et al.* (2017) complexos de Bi(V) e Bi(III) apresentaram $CI_{50} < 2,78 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} < 0,18 \mu\text{g/mL}$ contra formas promastigotas de *Leishmania tropica* e *Leishmania major*, respectivamente.

Quanto a toxicidade, o bismuto é um metal considerado relativamente não tóxico para os humanos, embora seja capaz de fornecer uma poderosa atividade antimicrobiana (ONG; KEDZIERSKI; ANDREWS, 2018).

Nesse estudo a viabilidade celular de macrófagos peritoneais murinos foi superior a 90% quando expostas as NPsBi, tomando como base a classificação apresentada por Oliveira (2009), as NPsBi são consideradas não tóxicas para as células testadas; observou-se, também que a toxicidade do bismuto foi semelhante ao Glucantime[®] e que o MES avaliado isoladamente apresentou citotoxicidade moderada aos macrófagos peritoneais murinos (> 58% de viabilidade celular).

Resultados semelhantes a esse estudo são descritos por Pathak *et al.* (2017) que determinou que compostos de bismuto não apresentaram toxicidade para fibroblastos humanos (100% de viabilidade celular) e ao estudo de Andleeb *et al.* (2019) que sugerem que todos os compostos de bismuto testados foram significativamente atóxicos em altas concentrações (20 $\mu\text{g/mL}$) para linfócitos humanos.

Assim, os resultados obtidos neste estudo e em relatos na literatura demonstram que o bismuto é uma alternativa interessante em sua forma nanoparticulada e complexada (como tem sido apresentado na literatura), por apresentar diferentes estados de oxidação que podem ser utilizados visando maior eficácia na atividade antileishmania e menor toxicidade em relação ao antimônio pentavalente (ONG; KEDZIERSKI; ANDREWS, 2018).

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstraram que as nanopartículas de bismuto não foram citotóxicas em macrófagos peritoneais murinos e foram mais eficazes na redução da viabilidade das formas promastigotas e taxa de infecção em *L. (L.) amazonensis*, indicando que novos estudos devem ser desenvolvidos para averiguar a antileishmania atividade *in vivo* e os mecanismos de ação dessas NPsBi.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Programa Europeu Horizon 2020 MSCA-RISE-2016 –VAHVISTUS.

REFERÊNCIAS

ANDLEEB S, IMTIAZ-UD-DIN; RAUF MK, AZAM SS, HAQ I, TAHIR MN, AHMAD S. Bioactive Heteroleptic Bismuth(V) Complexes: Synthesis, Structural Analysis and Binding Pattern Validation. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, p. e5061. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aoc.5061>. Acesso em: 5 out. 2020.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia antileishmania: Uma revisão bibliográfica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 2072-2104. 2016. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v8n6a21.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2017. 2. Ed. Brasília-DF. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 11 mar. 2020.

CHAGAS, A. F. S; PORCHIA, M.; TISATO, F.; SOLDERA, P F.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; NAIFF, M. F.; FRANCO, A. M. R. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity of copper(I) complexes. **Acta Brasiliensis**, v.5, n. 1, p. 1-6. 2021. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/474/115>. Acesso em: 12 jun. 2021.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273. 2013. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88556>. Acesso em: 23 mai. 2020.

ISLAM, A.; SILVA, D. G. J.; BERBET, M. F.; SILVA, D. M. S.; RODRIGUES, L. B.; BERALDO, L.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Novel triphenylantimony(V) and triphenylbismuth(V) complexes with benzoic acid derivatives: structural characterization, *in vitro* antileishmanial and antibacterial activities and cytotoxicity against macrophages, **Molecules**, v. 19, p. 6009–6030. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824136/>. Acesso em: 1 out. 2020.

KANATZIDIS, M. G.; SUN, H.; Dehnen, S. Bismuth - the magic element. **Inorganic Chemistry**, v. 59, p. 3341-3343. 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.inorgchem.0c00222>. Acesso em: 19 jun. 2020.

KEOGAN, D. M.; GRIFFITH, D. M. Current and Potential Applications of Bismuth-Based Drugs. **Molecules**, v. 19, p. 15258-15297. 2014. doi:10.3390/molecules190915258. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6271281/pdf/molecules-19-15258.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2020.

LIZARAZO-JAIMES, E. H.; MONTE-NETO, R.L.; REIS, P. G.; FERNANDES, N. G.; SPEZIALI, N. L.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Improved Antileishmanial Activity of Dppz through Complexation with Antimony(III) and Bismuth(III): Investigation of the Role of the Metal. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12622-12635. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6268262/>. Acesso em: 29 set. 2020.

NASCIMENTO, N. R. F.; DE AGUIAR, F. L. N.; SANTOS, C. F.; LUNA COSTA, A. M.; DE JESUS HARDOIM, D.; DA SILVA CALABRESE, K.; GADELHA ROCHA, M. F. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 196, p. 61–65. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18307381>. Acesso em: 11 mar. 2020.

OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1534/1/417400.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ONG, Y. C.; KEDZIERSKI, L.; ANDREWS, P. C. Do bismuth complexes hold promise as antileishmanial drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 14, p. 1721–1733. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29961352/>. Acesso em: 23 set. 2020.

PATHAK, A.; BLAIR, V. L.; FERRERO, R. L.; KEDZIERSKI, L. ANDREWA, P. C. Structural influences on the activity of bismuth(III) indole-carboxylato complexes towards *Helicobacter pylori* and *Leishmania*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 177, p. 166-275. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013417301381>. Acesso em: 19 jun. 2020.

ZIGMUNDO, G. C. O.; CRUZ, K. P.; HERPICH, T. L.; GABRIEL, K. U. H. L.; RIVERO, L. F. R.; MARTINS, M. A. T.; MARTINS, M. D. American Tegumentary Leishmaniasis: report of a case. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 3, p. e201. 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212440320305873>. Acesso em: 23 set. 2020.

5 DISCUSSÃO GERAL

As DTNs formam um grupo diversificado de 20 doenças que possuem como singularidade o alto impacto negativo nas comunidades empobrecidas. Essas doenças afetam mais de 1 bilhão de pessoas mundialmente, tendo consequências devastadoras na sociedade, economia e saúde (WHO, 2020). Atualmente, os tratamentos indicados pela WHO para as DTNs apresentam limitações, sendo imprescindível o desenvolvimento de alternativas viáveis para o tratamento dessas doenças (ONG *et al.*, 2018).

Neste cenário, inclui-se a leishmaniose tegumentar, que está classificada como uma DTN, apresentando notificação em 92 países, dentre estes o Brasil, que se apresenta endêmico com notificação em todos os estados (WHO, 2021). No estudo realizado por Ong *et al.* (2018) é apresentado os medicamentos utilizados para o tratamento da LT, tendo como droga de primeira escolha o antimoniato pentavalente (que tem sido utilizado por mais de 70 anos) e as drogas alternativas incluem anfotericina B, anfotericina B lipossomal, pentaminina, miltefosina e paromomicina.

Assim como as demais DTNs, os tratamentos disponíveis atualmente para a LT possuem limitações, sendo as principais a alta toxicidade e custo, a resistência parasitária, a administração parenteral (com exceção da miltefosina) e a dificuldade na adesão ao tratamento (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). Nesse contexto, Holanda *et al.* (2018) ressalta a evidente necessidade pela busca de novas alternativas terapêuticas mais efetivas para o tratamento da LT, com o intuito de diminuir os índices de morbimortalidade relacionados a doença.

Visando encontrar alternativas mais atraentes e que superem as limitações dos atuais tratamentos, diversos estudos tem avaliado os metais como agentes antileishmania, principalmente na forma complexada ou nanoparticulada. A utilização dos metais na forma complexada apresenta como principal vantagem a atuação multi-alvo, ou seja, os complexos metálicos podem atuar por meio de vários mecanismos de ação através da combinação da ação farmacológica do metal e do ligante (RAVERA *et al.*, 2018). Enquanto que as nanopartículas tem como principais vantagens a capacidade de circular por todo o corpo, controlar a distribuição da droga e realizar entrega direcionada para o local de ação (EBRAHIMI; SHIRAVAND; MAHMOUDVAND, 2017).

Um levantamento bibliográfico realizado por Chagas, Brasil e Franco (2021b) apresenta os diversos metais complexados em diferentes estados de oxidação que têm sido

investigados para a atividade antileishmania, como rutênio, prata, vanádio, zinco, cobalto, ouro, platina, cobre, paládio, entre outros. Dentre esses recebe destaque o cobre e o paládio que tem sido amplamente investigados, visto a alta capacidade de adaptação a diferentes ligantes, entretanto, verifica-se que apesar desses complexos apresentarem menor citotoxicidade a células hospedeiras, não apresentam eficácia antiparasitária superior aos medicamentos preconizados para o tratamento da LT (CHAGAS *et al.*, 2021; MÉNDEZ-ARRIAGA *et al.*, 2020; MÉNDEZ-ARRIAGA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020; VELÁSQUEZ *et al.*, 2017).

Os resultados descritos nesse estudo corroboram com os descritos na literatura, visto que nos ensaios *in vitro*, os complexos de cobre(I) e paládio(II) apresentaram toxicidade leve e moderada nas células hospedeiras. Nos ensaios com as formas evolutivas da *Leishmania* o complexo de cobre(I) apresentou eficácia superior aos tratamentos preconizados somente em *L. (V.) braziliensis* (promastigota e amastigota) e *L. (L.) amazonensis* (amastigota), enquanto que nos ensaios *in vivo* apresentou baixa eficácia no tratamento da LT experimental. Os complexos de paládio(II) apresentaram atividade antileishmania *in vitro* superior ao tratamento preconizado somente em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Quanto a utilização de metais na forma nanoparticulada para o tratamento da LT, os estudos de Saleem *et al.* (2019) e Souza *et al.* (2018) apresentam um levantamento de pesquisas que foram realizadas buscando avaliar a citotoxicidade em células hospedeiras e a atividade antileishmania de nanopartículas de ferro, zinco, prata, ouro, magnésio, titânio, selênio, entre outros; e as diferentes pesquisas relatadas demonstraram o potencial antileishmania de nanopartículas metálicas *in vitro* e *in vivo*, com eficácia superior aos tratamentos preconizados para LT, além de uma redução significativa na citotoxicidade.

Apesar dos diversos estudos explorando o potencial dos metais na forma nanoparticulada, a nosso saber, somente Domingos (2018) investigou a atividade antileishmania de nanopartículas de tântalo, e os resultados obtidos nesse estudo corroboram com o descrito pelo autor, visto que em ambos os estudos as NPsTa apresentaram baixa citotoxicidade nas células hospedeiras, atividade promissora *in vitro* nas formas evolutivas da *Leishmania*, porém, baixa eficácia no tratamento experimental *in vivo* da LT. Quanto a utilização de nanopartículas de bismuto, não há relatos na literatura, assim, observa-se que há um potencial a ser estudado, visto que nessa pesquisa a avaliação *in vitro* demonstrou que as NPsBi apresentaram atividade promissora nas formas evolutivas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

Diante dos resultados obtidos nesse estudo e nos relatos descritos na literatura a respeito da utilização dos metais na forma complexada e nanoparticulada é importante ressaltar que ainda há muito a ser estudado nessas áreas, considerando vantagens e limitações, visando identificar alvos no parasita e relações quantitativas estrutura-atividade para um desenho racional de medicamentos para a LT (RAVERA *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO GERAL

Complexo cobre(I)

- Na avaliação *in vitro* o complexo de cobre(I) apresentou atividade promissora contra as formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis* e citotoxicidade leve em macrófagos peritoneais murinos e moderada em monócitos humanos;
- Na avaliação *in vivo* o complexo de cobre(I) apresentou baixa eficácia no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental;
- Recomenda-se a realização de pesquisas adicionais utilizando diferentes concentrações, formulações, vias de administração e tempo de tratamento, sendo também necessário elucidar o mecanismo terapêutico e os aspectos toxicológicos.

Complexos de paládio(II)

- Na avaliação *in vitro* os complexos de paládio(II) apresentou atividade promissora contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e citotoxicidade moderada em macrófagos peritoneais murinos;

Nanopartículas de tântalo

- Na avaliação *in vitro* as nanopartículas de tântalo apresentaram atividade promissora contra as formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis* e citotoxicidade leve em macrófagos peritoneais murinos;
- Na avaliação *in vivo* as nanopartículas de tântalo apresentaram baixa eficácia no tratamento da leishmaniose tegumentar experimental;

Nanopartículas de bismuto

- Na avaliação *in vitro* as nanopartículas de bismuto apresentaram atividade promissora contra as formas evolutivas de *L. (V.) amazonensis* e citotoxicidade leve em macrófagos peritoneais murinos.

Assim, por meio dos resultados obtidos, se conclui que a utilização de metais na forma complexada e nanoparticulada, tem potencial para o tratamento de doenças parasitárias como a leishmaniose. Os complexos e nanopartículas testadas apresentaram baixa ou toxicidade moderada e com potencial antileishmania, assim, esses resultados podem fornecer um direcionamento para o desenvolvimento racional de novos complexos e nanopartículas que tenham maior potencial para o tratamento da leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

- AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 10, p. 940-959. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470229>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3. 2016. Disponível em <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004349>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- ALBUQUERQUE, M. L. E. de. **Infecção de macrófagos originados de monócitos rimários humanos com o parasito Leishmania amazonensis em microambientes normóxico e hipóxico**. 2006. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/315757>. Acesso em 05 jan. 2019
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4. 2017. Disponível em: <http://www.hsj.gr/medicine/leishmaniasis-a-review-on-parasite-vector-and-reservoir-host.pdf>. Acesso: 03 jan. 2018.
- ALMEIDA, B. V. N. **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos quelantes HEBP e EDTA em fibroblastos de ligamento periodontal humano**. 2012. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2012. Disponível em: <https://posodontoufpa.files.wordpress.com/2012/09/tc3adtulo-avaliac3a7c3a3o-in-vitro-da-citotoxicidade-dos-quelantes-hebp-e-edta-em-fibroblastos-de-ligamento-periodontal-humano.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2021.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombiana. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853-882, set./dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v10n3/19303.pdf>. Acesso em: 14 set. 2017.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P.; DAVID, H. M. Chemotherapy in the treatment and control of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, p. 223 - 271. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735166>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- AMBISOME® Injetável anfotericina B liposomal. São Paulo: Gilead Sciences, Inc. Farm. Resp.: Dr. Ademir Tesser - CRF-SP n.º 14.570. **Bula de remédio**. Disponível em: <http://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/ambisome.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- ANDLEEB S, IMTIAZ-UD-DIN; RAUF MK, AZAM SS, HAQ I, TAHIR MN, AHMAD S. Bioactive Heteroleptic Bismuth(V) Complexes: Synthesis, Structural Analysis and Binding Pattern Validation. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, p. e5061. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aoc.5061>. Acesso em: 5 out. 2020.

ANDRADE, B. L. A. **A produção do conhecimento em doenças negligenciadas no Brasil: uma análise bioética dos dispositivos normativos e da atuação dos pesquisadores brasileiros.** 2015. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/18316>. Acesso em: 05 jan. 2018.

ANDREINI, C.; BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; HOLLIDAY, G.L.; THORNTON, J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1205-1218. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604568>. Acesso em: 05 jan. 2018.

ANFOTERICINA B. São Paulo: União Química Farmacêutica Nacional S/A Farm. Resp.: Florentino Jesus Krencas CRF-SP nº 49136. **Bula de remédio.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9032052015&pIdAnexo=2892182. Acesso em: 05 jan. 2018.

ARNDT, A.; LIRIA, C. W.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MACHINI, M. T.; ULIANA, S. R. B.; ESPÓSITO, B. P. New iminodibenzyl derivatives with anti-leishmanial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 9–15. 2017. Disponível: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28414928/>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

BAIERLE, M.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; MORO, A.; BARBOSA JUNIOR, F.; GARCIA, S. J. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 6, p. 463-479. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpm/v46n6/a06v46n6.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Review Article Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 18, p. 42-48. 2008. Disponível em: <http://www.jpdp.com.pk/index.php/jpad/article/viewFile/564/537>. Acesso em: 05 jan. 2018.

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Challenges for metal in medicine: how nanotechnology may help to shape the future. **ACS nano**, v. 7, n. 7, p. 5654-5659. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23837396/>. Acesso em: 3 jan. 2020.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104. 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Lucas_Hoelz/publication/312415236_Antileishmanial_Chemotherapy_A_Literature_Review/links/5885f8d492851c21ff4d2db7/Antileishmanial-Chemotherapy-A-Literature-Review.pdf. Acesso em: 05 jan. 2018.

BISWARO, L. S. **Efeito das nanopartículas contendo itraconazol e recobertas com manose sobre leishmaniose visceral estudo *in vitro*.** 2016. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/20164>. Acesso em: 05 jan. 2018.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e

vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861-876. 2017. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v9n3a04.pdf>. Acesso em: 17 set. 2018.

BOCXLAER, K. V.; GAUKEL, E.; HAUSER, DEIRDRE.; PARK, S. H.; SCHOCK, S.; YARDLEY, V.; RANDOLPH, R.; PLATTNER, J. J.; MERCHANT, T.; CROFT, S. L.; JACOBS, R. T.; WRING, A. S. Topical Treatment for Cutaneous Leishmaniasis: DermatoPharmacokinetic Lead Optimization of Benzoxaboroles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n.5, p. e02419-17. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923108/>. Acesso em: 22 mai. 2020.

BODIMEADE, C.; MARKS, M.; MABEY, D. Neglected Tropical disease: elimination and eradication. **Clinical Medicine**, v. 19, p. 157 – 160. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6454364/>. Acesso em: 20 mar. 2019.

BOECHAT, N.; MAGALHÃES, J. Era uma vez... Doenças Negligenciadas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 195-196. 2012. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/291/247>. Acesso em: 17 set. 2018.

BOER, M. D.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment acess. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1471-1477. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14618619>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicineNanomédecine et nanotechnologies pour la médecine. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 12, n. 7, p. 620-636. 2011. Disponível em: https://hal.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/598930/filename/Boisseau_nanomedicine_CRAS.pdf. Acesso em: 16 jun. 2021.

BOUTALEB-CHARKI, S.; MARÍN, C.; MALDONADO, C. R.; ROSALES, M. J.; URBANO, J.; GUITIERREZ-SÁNCHEZ, R.; QUIRÓS, M.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Copper(II) Complexes effects Potential Anti-Parasitic Agents. **Drug Metabolism Letters**, v. 3, p. 35-44. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19356115/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

BRADFORD, S.; COWAN, J. A. From Traditional Drug Design to Catalytic MetalloDrugs: A Brief History of the Use of Metals in Medicine **MetalloDrugs**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563. 2014. Disponível em: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/medr.2015.1.issue-1/medr-2014-0002/medr-2014-0002.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2017. 2. Ed. Brasília-DF. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 11 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1 ed. Brasília. 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceraleddicao.pdf. Acesso em: 22 abr. 2019.

CABALLERO, A. B.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; QUIRÓS, M.; SALAS, J. M.; HUERTA, O.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; MARÍN, C.; CHAVES-LEMAUR, G.; GUTIERREZ-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 526e534. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523414007533>. Acesso em: 15 abr. 2020.

CABALLERO, A. B.; SALAS, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. **Metal-Based Therapeutics for Leishmaniasis. In: Leishmaniasis -Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment.** [s.l.] InTech, 2014. p. 465–493.

CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/1725>. Acesso em: 22 mai. 2020.

CARGNIN, S. T. **Triterpenos obtidos de fontes naturais: semissíntese, citotoxicidade e atividade antiprotozoária.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/166297/001045573.pdf?sequence=1>. Acesso em: 05 jan. 2018.

CARVALHO, S. H.; FREZARD, F.; PEREIRA, N. P.; MOURA, A., S.; RAMOS, L. M. Q. C.; CARVALHO, G. B.; ROCHA, M. O. C. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30681239/>. Acesso em: 05 jan. 2019.

CELESTE, B. J.; GUIMARÃES, M. C. S. Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to schneider's drosophila medium as assessed by anti-leishmania human sera. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 21, p. 63–67. 1988. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v30n2/01.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2020.

CHAGAS, A. C.; OLIVEIRA, F.; DEBRABANT, A.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M.; CALVO, E. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. **PLoS Pathogen**, v. 10, p. e1003923. 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1003923&type=printable>. Acesso em: 19 abr. 2019.

CHAGAS, A. F. S. **Avaliação da atividade anti-leishmania induzida por complexos metálicos de cobre.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5132>. Acesso em: 03 out. 2020.

CHAGAS, A. F. S.; BRASIL, A. M. V.; FRANCO, A. M. R. O desenvolvimento de metalodrogas para o tratamento da leishmaniose tegumentar: uma revisão integrativa da literatura. **European Academic Research**, n. 3, p. 1739-1757. 2021b. Disponível em: <https://www.euacademic.org/UploadArticle/4951.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2021.

CHAGAS, A. F. S.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; SOLDERA, P. F.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; NAIFFI, M. F.; FRANCO, A. M. R. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity of copper(I) complexes. **Acta Brasiliensis**, v. 5, n. 1, p. 1-6. 2021a. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/474>. Acesso em: 3 mai. 2021.

CHAI, Y.; YAN, S.; WONG, I. L. K.; CHOW, L. M. C.; SUN, H. Complexation of antimony (Sb(V)) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-D-mannose: formation of both mono- and bis-adducts. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 12, p. 2257 - 2263. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013405002448?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jan. 2018.

CHELLAN, P.; SADLER, P. J. The elements of life and medicines. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 373, n. 2037, p. 2014182-2014182. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4342972/>. Acesso em: 16 mai. 2021.

CHEMISTRY LIBRETEXTS. **Lewis Concept of acids and bases**. 2018. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Acids_and_Bases/Acid/Lewis_Concept_of_Acids_and_Bases](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Acids_and_Bases/Acid/Lewis_Concept_of_Acids_and_Bases). Acesso em: 4 jan. 2020.

CHEN, Y.; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 640–65. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11002900>. Acesso em: 17 set. 2018.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. **Atividade anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* de *Libidibia ferrea* e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea de Leishmaniose**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5133>. Acesso em: 6 jan. 2019.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; JENSEN, B. B.; GRAFOVA, I.; SANTOS, P. A.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; BARCELLOS, J. F. M.; SILVA, A. L. da.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 331-340. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aa/v47n4/1809-4392-aa-47-04-00331.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2020.

CUNHA, B. C. **Avaliação da atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico da própolis verde**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade

Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2017. Disponível em:

<https://repositorio.ufop.br/handle/123456789/8480>. Acesso em: 6 jan. 2020.

CUNHA, L. C.; LAGE, D. P.; FERREIRA, L. S.; MATILDE, L. S. V.; COELHO, E. A. F.; BELO, V. S.; TEXEIRA-NETO, R. G.; SOARES, L. F.; CHAGAS, R. C. R.; SILVA, E. S. Leishmanicidal activity of ibuprofen and its complexes with Ni(II), Mn(II) and Pd(II).

Inorganic Chemistry Communications, v. 113, p. 107756. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1387700319303508>. Acesso em: 1 out. 2020.

CUVILLIER, A.; MIRANDA, J.C.; AMBIT, A.; BARRAL, A.; MERLIN, G. Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70 L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. **Cellular Microbiology**, v. 5, p. 717-728, ago. 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2003.00316.x/epdf>. Acesso: 03 jan. 2018.

DE AGUIAR, G. M.; VIEIRA, V. R. Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. **Brazilian Sand Flies**, p. 251–298. 2018. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-75544-1_4. Acesso em: 19 abr. 2019.

DE SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUJUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LOBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. (1-2), p. 421–431. 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/176438>. Acesso em:

DELLA PEPA, M. E.; MARTORA, F.; FINAMORE, E.; VITIELLO, M.; GALDIERO, M.; FRANCI, G. **Role of Nanoparticles in Treatment of Human Parasites**. In: Rai M., Alves dos Santos C. (eds) Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology. Springer, Cham. 2017. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-70299-5_13. Acesso em: 5 abr. 2021.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUCVEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1570, n. 3, p. 192-198. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020809>. Acesso em: 05 jan. 2018.

DNDi. **Best Science for the Most Neglected**. 2018a. Disponível em: www.dndi.org/. Acesso em: 05 jan. 2019.

DNDi. **Tratamentos atuais**. 2018b. Disponível em: <https://www.dndi.org/doencas/leishmanioses/tratamentos-atuais-leish/>. Acesso em: 05 jan. 2019.

DOMINGOS, P. R. C. **Avaliação da eficácia de diamidínicos fluorados e nanopartículas metálicas na leishmaniose cutânea**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 2018. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6600>. Acesso em: 3 mai. 2021.

EBRAHIMI, K.; SHIRAVAND, S.; MAHMOUDVAND, H. Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Capparis spinosa* fruit and investigation of its

antibacterial activity. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 4, p. 866-871. 2017.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/320214507_Biosynthesis_of_copper_nanoparticles_using_aqueous_extract_of_Capparis_spinosa_fruit_and_investigation_of_its_antibacterial_activity. Acesso em: 1 ago. 2021.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–62. 2009. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299149>. Acesso em: 17 set. 2018.

FERES, M. V. C.; SILVA, L. A.; CUCO, P. H. O.; SILVA, A. R. A contradição entre a regulamentação existente e a complexidade dos fatos reais no caso das drogas para doenças negligenciadas. **Revista Brasileira de Políticas Públicas**, v. 6, n. 3, p. 193-208. 2016.

FIGUEIRA, L. P.; ZANOTTI, M.; PINHEIRO, F. G.; FRANCO, A. M. R. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, p. 512-514, 2008. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n5/a16v41n5.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.

FILHO, R. A. S.; OLIVEIRA, D. R.; DUTRA, V. B. P.; MEIRELES, N. M.; ANJOS, L.; MOURA, G. M. R. Tratamento das lesões causadas pela leishmaniose tegumentar. **Revista Liberum Acessum**, v. 3, n. 1, p. 29-36. 2020. Disponível em:

<http://revista.liberumaccesum.com.br/index.php/RLA/article/view/47/42>. Acesso em: 13 jun. 2021.

FRANCO, A. M. R.; GRAFOVA, I.; SOARES, F. V.; GENTILE, G.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. C.; BOLSON, M. A, SARGENTINI JR, E.; CARFAGNA, C.; LESKELA, M.; GRAFOV, A. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6771–6780. 2016. Disponível em: <https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=34032>. Acesso em: 3 mar. 2021.

FRANCO, L. P.; DE GÓIS, E. P.; CODONHO, B. S.; PAVAN, A. L. R.; DE OLIVEIRA PEREIRA, I.; MARQUES, M. J.; DE ALMEIDA, E. T. Palladium(II) imine ligands cyclometallated complexes with a potential leishmanicidal activity on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 3, p. 1049–1056. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00044-012-0095-x>. Acesso em: 1 out. 2020.

GALATI, E. A. B.; GALVIS-OVALLOS, FREDY.; LAWYER, P.; LÉGER, N.; DEPAQUIT, J. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite Journal**, v. 24, n. 26. 2017. Disponível em: <https://www.parasite-journal.org/articles/parasite/pdf/2017/01/parasite170028.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.

GANDIN, V.; TISATO, F.; DOLMELLA, A.; PELLEI, M.; SANTINI, C.; GIORGETTI, M.; MARZANO, C.; PORCHIA, M. *In vitro* and *in vivo* Anticancer Activity of Copper(I) Complexes with Homoscorpionate Tridentate Tris(pyrazolyl)borate and Auxiliary Monodentate Phosphine Ligands. **Journal Medical for Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4745 –

4760. 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm500279x>. Acesso em: 05 jan. 2018.

GARNIER, T.; CROFT, S. L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 3, n. 4. 2002. Disponível em: <https://uhra.herts.ac.uk/bitstream/handle/2299/631/103422.pdf;sequence=1>. Acesso em: 19 jun. 2020.

GASSER, G.; PRIZE, W. Metal Complexes and Medicine: A Successful Combination. **Chimia**, v. 69, p. 442–446. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26507597>. Acesso em: 08 dez. 2019.

GLUCANTIME[®]: Antimoniato de Meglunima. São Paulo: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Farm. Resp.: Silvia Regina Brollo - CRF - SP nº 9.815. **Bula de remédio**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=991282015&pIdAnexo=2435258. Acesso em: 05 jan. 2018.

GLUENZ, E.; HOOG, J. L.; SMITH, A. E.; DAWE H. R.; SHAW M.K.; GULL, K. Beyond 9 p 0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 9, p. 3117-3121, set. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923350/>. Acesso: 03 jan. 2018.

GOIS, E. P. de. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de complexos de paládio(II) contendo ligante imínico**. 2018. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2018. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1424>. Acesso em: 19 jun. 2020.

GONÇALVES, R.; ZHANG, X.; COHEN, H.; DEBRABANT, A.; MOSSER, D. M. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, p. 1253–1265. 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3173254/pdf/JEM_20101751.pdf. Acesso em: 19 abr. 2019.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–33. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20377337>. Acesso em: 20 abr. 2019.

GRAMICCIA, M.; GRANDONI, L. The Current Status of Zoonotic Leishmaniasis and Approaches to Disease Control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n.11-12, p. 1169-1180. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16162348/>. Acesso em: 23 dez. 2018.

GREENWOOD, N.N. Vanadium to dubnium: from confusion through clarity to complexity. **Catalysis Today**, v.78, p. 5-11. 2003. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586102003188?casa_token=cUQyT7rrCRMAAAAA:JxG97n8OpfhH3m2FzPufAOfSz4IVyGEqo-4i7qo41vh5bLyzztREFG_w-FgO3tjiMIWrimhV5TU. Acesso em: 5 jan. 2020.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501. 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150849>. Acesso em: 05 jan. 2018.

GUPTA, A.; GUPTA, R. K.; GUPTA, G. S. Targeting cells for drug and gene delivery: Emerging applications of mannans and mannan binding lectins. **Journal of scientific and industrial research**, v. 68, n. 465–83. 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228964736_Targeting_cells_for_drug_and_gene_delivery_Emerging_applications_of_mannans_and_mannan_binding_lectins. Acesso em: 17 set. 2018.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, p. 911-926. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019096221401915X>. Acesso em: 20 abr. 2019.

HANIF, M.; SHAH, S.; RASUL, A.; ABBAS, G.; ZAMAN, M.; AMJAD, M. W.; RAJA, M. A. G.; KHAN, H. U.; ASHFAQ, M.; IQBAL, O. Enhancement of oral bioavailability of ibandronate through gastroretentive raft forming drug delivery system: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 4847-48-58. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7367921/#>. Acesso em: 14 jun. 2021.

HE, C.; HU, Y.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Biomaterials Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, p. 3657–66. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210000979>. Acesso em: 10 jan. 2020.

HLAVACOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 955–958. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/258248413_The_Effect_of_Temperature_on_Leishmania_Kinetoplastida_Trypanosomatidae_Development_in_Sand_Flies. Acesso em: 19 abr. 2019.

HOLANDA, V. N.; SILVA, W. V. da.; NASCIMENTO, P. H. do.; OLIVEIRA, R. N.; LIMA, V. L. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. de. Desafios e perspectivas no tratamento da leishmaniose tegumentar: revisão de literatura. **Revista Interfaces: saúde, humanas e tecnologia**, v. 6, n. 17, p. 140-157. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Pedro-Nascimento-21/publication/333396603_CHALLENGES_AND_PERSPECTIVES_IN_THE_TREATMENT_OF_TEGUMENTARY_LEISHMANIOSIS_REVIEW/links/5cebc94f458515712ec63966/CHALLENGES-AND-PERSPECTIVES-IN-THE-TREATMENT-OF-TEGUMENTARY-LEISHMANIOSIS-REVIEW.pdf. Acesso em: 31 jul. 2021.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 265-273. 2013. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88556>. Acesso em: 2 mar. 2021.

HUSSAIN, A.; ALAJMI, M. F.; REHMAN, M. T.; AMIR, S.; HUSSAIN, F. M.; ALSALME, A.; SIDDIQUI, M. A.; ALKHEDHAIRY, A. A.; KHAN, R. A. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: *In vitro and in vivo studies*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5237, p. 1–17. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41063-x>. Acesso em: 15 abr. 2020.

ISLAM, A.; SILVA, D. G. J.; BERBET, M. F.; SILVA, D. M. S.; RODRIGUES, L. B.; BERALDO, L.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Novel triphenylantimony(V) and triphenylbismuth(V) complexes with benzoic acid derivatives: structural characterization, *in vitro* antileishmanial and antibacterial activities and cytotoxicity against macrophages, **Molecules**, v. 19, p. 6009–6030. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824136/>. Acesso em: 1 out. 2020.

JIN, Y.; MA, X.; FENG, S.; LIANG, X.; DAI, Z.; TIAN, J.; YUE, X. Hyaluronic Acid Modified Tantalum Oxide Nanoparticles Conjugating Doxorubicin for Targeted Cancer Theranostics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 2530-2541. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26554699/>. Acesso em: 1 jan. 2021.

KANATZIDIS, M. G.; SUN, H.; Dehnen, S. Bismuth - the magic element. **Inorganic Chemistry**, v. 59, p. 3341-3343. 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.inorgchem.0c00222>. Acesso em: 19 jun. 2020.

KASTENHOLZ, B. Comparison of the Electrochemical Behavior of the High Molecular Mass Cadmium Proteins in Arabidopsis thaliana and in Vegetable Plants on Using Preparative Native Continuous Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PNC-PAGE). **Electroanalysis**, v. 18, n. 1, 0. 103-106. 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/elan.200403344>. Acesso em: 05 jan. 2018.

KASTENHOLZ, B. New hope for the diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. **Protein & Peptide Letters**, v. 14, n. 4, p. 389-393. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504097>. Acesso em: 05 jan. 2018.

KEOGAN, D. M.; GRIFFITH, D. M. Current and Potential Applications of Bismuth-Based Drugs. **Molecules**, v. 19, p. 15258-15297. 2014. doi:10.3390/molecules190915258. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6271281/pdf/molecules-19-15258.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2020.

KHAN, M. R.; ZAIB, S.; KHAN, A.; BADSHAH, A.; RAUF, M. K.; IMTIAZ-UD-DIN; TAHIR, M. N.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Pd(II)-based heteroleptic complexes with N-(acyl)-N', N'-(disubstituted)thioureas and phosphine ligands: Synthesis, characterization and cytotoxic studies against lung squamous, breast adenocarcinoma and *Leishmania tropica*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 479, p. 189–196. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020169317319072>. Acesso em: 1 out. 2020.

KHAN, M. R.; ZAIBD, S.; KHAN A.; BADSHAH, A.; RAUF, M. K.; IMTIAZ-UD-DIN; TAHIR, M. N.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Pd(II)-based heteroleptic complexes with N-(acyl)-N₀,N₀-(disubstituted)thioureas and phosphine ligands: Synthesis, characterization and cytotoxic studies against lung squamous, breast adenocarcinoma and *Leishmania tropica*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 479, p. 189–196. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324837052_PdII-Based_heteroleptic_complexes_with_N-acyl-N'-N'-disubstitutedthioureas_and_Phosphine_ligands_Synthesis_characterization_and_cytotoxic_studies_against_lung_squamous_breast_adenocarcinoma_and_Leishm. Acesso em: 19 jun. 2020.

KIM, S.; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 4 jan. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv951>. Acesso em: 3 jan. 2020.

KRAATZ, H. B.; METZLER-NOLTE, N. **Concepts and models in bioinorganic chemistry**, Wiley-VCh, New York, 2006. Disponível em: <https://www.wiley.com/en-us/Concepts+and+Models+in+Bioinorganic+Chemistry-p-9783527313051>. Acesso em: 05 jan. 2018.

KRUPANIDHI, S.; SREEKUMAR, A.; SANJEEVI, C. B. Copper & biological health. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 4, p. 448-461. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19106440/>. Acesso em: 4 jan. 2020.

LEEVRE. **Folheto técnico**. 2015. Disponível em: <https://www.vetsmart.com.br/cg/estudo/13173/folheto-tecnico-leevre>. Acesso em: 26 mai. 2021.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B.M.; LIEEDALE, G.F.; LEOBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, n. 27, p. 37-58, 1980. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Jiri_Vavra/publication/16209026_A_new_revised_classification_of_the_Protozoa/links/55438d0a0cf24107d3962fe2/A-new-revised-classification-of-the-Protozoa.pdf. Acesso: 04 jan. 2018.

LIZARAZO-JAIMES, E. H.; MONTE-NETO, R.L.; REIS, P. G.; FERNANDES, N. G.; SPEZIALI, N. L.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Improved Antileishmanial Activity of Dppz through Complexation with Antimony(III) and Bismuth(III): Investigation of the Role of the Metal. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12622-12635. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6268262/>. Acesso em: 29 set. 2020.

LORINCZ, M. T. Neurologic Wilson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1184, n. 1, p. 173-187. 2010. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2009.05109.x>. Acesso em 10 jan. 2020.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L. H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A. T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R. S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E. M. C. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 4, n. 12, p. 1 – 6. 2010. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/41434/2/ve_Paulo_Machado_etal.pdf. Acesso em: 4 jan. 2020.

MAFFEI, R. S.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B.; ESPÓSITO, B. P. Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial activity of copper(II) with fluorinated α -hydroxycarboxylate ligands. **BioMetals**, v. 22, n. 6, p. 1095-1101. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-009-9260-1>. Acesso em: 08 dez. 2019.

MAGNER, L. **Native Civilizations and Cultures of the Americas. A History of Medicine**. 2005. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/ankitabali1/a-history-of-medicine-2nd-ed-l-magner-taylor-and-francis-2005-ww>. Acesso em: 05 jan. 2018.

MAGNETO, S.; BOISSIER, S.; DELMAS, P. D.; CLEZARDIN, P. Additive antitumor activities of taxoids in combination with the bisphosphonate ibandronate against invasion and adhesion of human breast carcinoma cells to bone. **International Journal of Cancer**, v. 83, p. 263-269. 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291097-0215%2819991008%2983%3A2%3C263%3A%3AAID-IJC19%3E3.0.CO%3B2-T>. Acesso em: 14 jun. 2021.

MALKIN, R.; MALMSTROM, B. G. The state and function of copper in biological systems. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 33, p. 178-239. 1970. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9780470122785.ch4>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MARET, W. The metals in the biological periodic system of the elements: concepts and conjectures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-8. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742035>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MARQUES, C. S. F.; JÚNIOR, J. B. M.; ANDRADE, L. R. M.; ANDRADE, L. N.; SANTOS, A. L. S.; CRUZ, M. S. P.; CHAUD, M.; FRICKS, A. T.; SEVERINO, P. Use of pharmaceutical nanotechnology for the treatment of leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1-5. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/9nnCTfyfQ5pTjmQQLZRpXqc/?lang=pt>. Acesso em: 16 jun. 2021.

MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J.; DAZA-RIVERA, C. F.; ROSALES-CHIMALA, M.; COSSIO, A.; RICÓN, E. J. C.; DESAI, M. M.; SARAIVA, G. N.; GÓMEZ, M. A. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 11, p. :e0005713. 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pntd.0005713>. Acesso em: 12 jun. 2021.

MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; LAURIS, J. R. P.; MARTINS, A. C. G. P. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 98, n. 1, p. 52-58. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/5fyTRBVbB3HDp5m556ZsTDq/?lang=en>. Acesso em: 2 fev. 2021.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **An Journal of Medicine**, v. 107, p. 7-14. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869292/>. Acesso em: 05 jan. 2018.

MEDICI, S.; PEANA, M. F.; ZORODDU, M. A. Noble metals in pharmaceuticals applications and limitations. **Biomedical Applications of Metals**, p. 3 – 48. 2018. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-74814-6_1. Acesso em: 26 abr. 2019.

MÉNDEZ-ARRIAGA, J. M.; OYARZABAL, I.; ESCOLANO, G.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; SALAS, J. M. *In vitro* leishmanicidal and trypanocidal evaluation and magnetic properties of 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5- a]pyrimidine Cu(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 180, 26–32. 2018. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.11.027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29227923/>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MÉNDEZ-ARRIAGA, J. M.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. *In vitro* leishmanicidal activity of copper(II) 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,2,4]Triazolo [1,5-a]Pyrimidine Derivatives as [1,5-a]pyrimidine complex and analogous transition metal series. **Polyhedron**, v. 176, v. 114272, p. 1–6. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S027753871930717X>. Acesso em: 22 mai. 2020.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563. 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr400460s>. Acesso em: 08 jan. 2018.

MONTEIRO, L. M. **Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofurais: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida potencial**. 2013. Dissertação (Mestrado FÁrmaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-29052013-153901/en.php>. Acesso em: 14 set. 2017.

MOREIRA, V. R. **Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) causa danos ao DNA por estresse oxidativo e induz superexpressão de genes envolvidos na defesa antioxidante e reparo do DNA**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, 2017. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/1767/2/Vanessa%20Ribeiro%20Moreira.pdf> 2017. Acesso em: 05 jan. 2018.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Seminar**, v. 77, p. 366-1561. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16257344/>. Acesso em: 22 jun. 2020.

NAIFF JÚNIOR, R. D.; PINHEIRO, F. G.; NAIFF, M. F.; SOUZA, I. S.; CASTRO, L. M.; MENEZES, M. P.; FRANCO, A. M. R. Estudo de uma série de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 2, p. 103-114. 2009. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/6610>. Acesso em: 05 jan. 2018.

NASCIMENTO, N. R. F.; DE AGUIAR, F. L. N.; SANTOS, C. F.; LUNA COSTA, A. M.; DE JESUS HARDOIM, D.; DA SILVA CALABRESE, K.; GADELHA ROCHA, M. F. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 196, p. 61–65. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18307381>. Acesso em: 11 mar. 2020.

NASSIF, P. W.; MELLO, T. F. P.; NAVASCONI, T. R.; MOTA, C. A.; DEMARCHI, I. G.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology**, v. 144, p. 995-1004. 2017. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/C494DB655A3CB70CD2D099D305BF4825/S0031182017000385a.pdf/safety_and_efficacy_of_current_alternatives_in_the_topical_treatment_of_cutaneous_leishmaniasis_a_systematic_review.pdf. Acesso em: 19 jun. 2020.

NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; ARRIECHE, D.; MARCHAN, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 364-369. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568241/>. Acesso em: 11 mar. 2020.

NEVES, D. P. *Parasitologia dinâmica*. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
OLIVEIRA, L. F. G.; PEREIRA, B. A. S.; GILBERT, B.; CORRÊA, A. L.; ROCHA, L.; ALVES, C. R. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, p. 219-233. 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-016-9471-3>. Acesso em: 12 jun. 2021.

NICOLLE, C. Culture du parasite du bouton d'orient. **CR Academic Science**, v. 146, p. 842-843. 1908.

OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1534/1/417400.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021

ONG, Y. C.; KEDZIERSKI, L.; ANDREWS, P. C. Do bismuth complexes hold promise as antileishmanial drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 14, p. 1721–1733. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29961352/>. Acesso em: 23 set. 2020.

ONG, Y. C.; ROY, S.; ANDREWS P. C.; GASSER, G. Metal Compounds against Neglected Tropical Diseases. **Chemical Reviews**, v. 119, p. 730-796. 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.8b00338>. Acesso em: 08 dez. 2019.

- ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 925-932. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516301572>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- OTTO, V.; FRANÇA, F.; HORFLER, R. Formas farmacêuticas semissólidas para tratamento tópico. **Fármaco Terapêutica**, p. 3-9. 2018. Disponível em: <http://revistas.cff.org.br/?journal=boletimfarmacoterapeutica&page=article&op=view&path%5B%5D=2336>. Acesso em: 23 jun. 2020.
- PASSALACQUA, T. G. **Efeito de compostos ciclopilados em formas promastigotas e amastigotas de Leishmania infantum**. 2018. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/154561>. Acesso em: 19 jun. 2020.
- PATHAK, A.; BLAIR, V. L.; FERRERO, R. L.; KEDZIERSKI, L. ANDREWA, P. C. Structural influences on the activity of bismuth(III) indole-carboxylato complexes towards *Helicobacter pylori* and *Leishmania*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 177, p. 166-275. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013417301381>. Acesso em: 19 jun. 2020.
- PATRA, S. C.; ROY, A. S.; BANERJEE, S.; BANERJEE, A.; DAS SAHA, K.; BHADRA, R.; PRAMANIK, K.; GHOSH, P. Palladium(II) and platinum(II) complexes of glyoxalbis(N-aryl)osazone: molecular and electronic structures, anti-microbial activities and DNA-binding study. **New Journal of Chemistry**, v. 43, p. 9891–9901. 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/nj/c9nj00223e#!divAbstract>. Acesso em: 1 out. 2020.
- PATRÍCIO, S. M. DA. S. **Incorporação do óleo de nim em pomada hidrofóbica**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/6690/1/SAMARA%20MARQUES%20DA%20SILVA%20PATR%C3%8DCIO%20-%20TCC%20FARM%C3%81CIA%202018.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2020.
- PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1395-1405. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113264>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- PELAZ, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, p. 2313–2381. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28290206>. Acesso em: 17 set. 2018.
- PINTO, M. O. K. M.; OLIVEIRA, T. M.; AGUIAR, A. N. A.; PINTO, P. E. M.; BARBOSA, D. S.; DINIZ, S. A.; SILVA, M. X. Profile of American tegumentary leishmaniasis in transmission areas in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2007 to 2017. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, p. 1-9. 2020. Disponível em:

<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12879-020-4860-z.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2021.

PORCHIA, M.; TISATO, F. ZANCATO, M.; GANDIN, V.; MARZANO, C. *In vitro* antitumor activity of water-soluble copper(I) complexes with diimine and monodentate phosphine ligands. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 998-1110. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535217301715>. Acesso em: 24 jun. 2020.

PORTAS, A. DOS S.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B.; ESPÓSITO, B. P. Increasing the activity of copper(II) complexes against *Leishmania* through lipophilicity and pro-oxidant ability. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 107–112. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-011-0834-3>. Acesso em: 6 jan. 2020.

QUINNEL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J.J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p. 195-200. 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1421498>. Acesso em: 05 jan. 2018.

RAMOS, P. H. **Complexos metálicos (ferro, níquel e cobalto) em sistemas de oxidação do tipo fenton: reações e mecanismos**. 2011. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2208/1/TESE_Complexos%20met%20C3%A1licos%20%28ferro%20n%20n%20C3%ADquel%20e%20cobalto%29%20em%20sistemas%20de%20oxida%20C3%A7%20do%20tipo%20Fenton%20rea%20C3%B5es%20e%20mecanismos.pdf. Acesso em: 08 dez. 2019.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R.; CARVALHO, B. M.; COSTA, S. M.; SHAW, J. J. Sandy Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Springer**, p. 341-380. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/326046256_Sand_Fly_Vectors_of_American_Cutaneous_Leishmaniasis_in_Brazil. Acesso em: 19 abr. 2019.

RAVERA, M.; MORENO-VIGURI, E.; PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; GABANO, E. Organometallic compounds in the discovery of new agents against kinetoplastid-caused diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.15, p. 459-482. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523418304574?via%3Dihub>. Acesso em: 1 ago. 2021.

RAYCHAUDHURY, B; BANERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R. V.; DATTA, S. C. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta tropica**, v. 95, n. 1, p. 1 - 8. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896700>. Acesso em: 05 jan. 2018.

RAYMOND, R. W.; MCHUGH, C. P.; WITT, L. R.; KERR, S. F. Temporal and spatial distribution of *Leishmania mexicana* infections in a population of *Neotoma micropus*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 171-180. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v98n2/v98n2a02.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.

REDDY, K. R. Current perspectives on leishmaniasis. **Journal of Gandaki Medical College-Nepal**, v. 12, n. 1. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2889651/>. Acesso em: 21 abr. 2019.

ROCHAEL, N. C.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; DEZOUZA-VIERIA, T. S.; OLIVEIRA, M. P.; SOUZA, L. F. G.; OLIVEIRA, M. F.; SARAIVA, E. M. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by *Leishmania* parasites. **Scientific Reports**, v. 5, p. 18302. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682131/pdf/srep18302.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2019.

ROHOUSOVA, I.; TALMI-FRANK D.; KOSTALOVA, T.; POLANSKA, N.; LESTINOVA, T.; KASSAHUN, A.; YASUR-LANDAU, D.; MAIA, C.; KING, R.; VOTYPKA, J.; JAFFE, C. L.; WARBURG, A.; HAILU, A.; VOLF, P.; BANETH, G. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites & Vectors**, v. 8. 2015. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4495613/pdf/13071_2015_Article_976.pdf. Acesso em: 05 jan. 2018.

ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 251-262. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4241529/pdf/main.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2018.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/intimm/article/30/3/103/4774287>. Acesso em: 19 abr. 2019.

SABINO, G. L. **Investigação da reatividade de complexos metálicos com ligantes bases de Schiff a infecções parasitárias**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/USP_dff26a279382df95551d72339f247c3b. Acesso: 6 jan. 2020.

SAEED, A.; LARIK, F. A.; JABEEN, F.; MEHFOOZ, H.; GHUMRO, S. A.; EL-SEEDI, H. R.; ASHRAF, H. Synthesis, Antibacterial and Antileishmanial Activity, Cytotoxicity, and Molecular Docking of New Heteroleptic Copper(I) Complexes with Thiourea Ligands and Triphenylphosphine. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 541–550. 2018. doi:10.1134/s1070363218030246. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1070363218030246>. Acesso em: 6 jan. 2020.

SALEEM, K.; KHURSHEED, Z.; HANO, C.; ANJUM, I.; ANJUM, S. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recent advances and challenges. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, p. 1-18. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/9/12/1749>. Acesso em: 1 ago. 2021.

SANCHEZ, C.; SHEA, K. J.; KITAGAWA, S.; Recent progress in hybrid materials science. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 471-472, 2011. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/cs/c1cs90001c>. Acesso em: 25 abr. 2020.

- SANJAY, K. B.; SINGH, S. Metal Based Drugs: Current Use and Future Potential. **Der Pharmacia Lettre**, v. 1, n. 2, p. 39-51. 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/267961271_Metal_Based_Drugs_Current_Use_and_Future_Potential. Acesso em: 3 jan. 2020.
- SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. R.; GUIMARÃES E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e29510716543, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16543/14807>. Acesso em: 31 jul. 2021.
- SANTOS, L. M.; SARTO, L. E.; BOZZA, G. F.; DE ALMEIDA, E. T. Química de Coordenação: Um Sonho Audacioso de Alfred Werner. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n.5, p. 1260-1281. 2014. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v6n5a10.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2019.
- SANTOS, R. V.; COIMBRA, C. E. A. J. Saúde & Povos Indígenas. **Editora FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 336 - 344, abr./jun. 1994. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v11n2/v11n2a18b.pdf>. Acesso em: 14 set. 2017.
- SCHELLACK, G. **Farmacologia uma abordagem didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Imunology**, v. 16, p. 581 – 592. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27424773>. Acesso em: 19 abr. 2019.
- SILVA, L. R. M. **Ácido elágico modificado por nanopartículas de óxido de magnésio: síntese de material híbrido, caracterização e avaliação das atividades citotóxica e antileishmania**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpi.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/723/Disserta%20c3%a7%20a3%20completa%203.pdf?sequence=1>. Acesso em: 19 abr. 2019.
- SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose Tegumentar Americana – casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação- Brasil**. [Internet]. 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 03 mar. 2021.
- SINGH, M. K.; BHAUMIK, S. K.; KARMAKAR, S.; PAUL, J.; SAWOO, S.; MAJUMDER, H. K.; ROY, A. Copper salicylaldehyde (CuSAL) imparts protective efficacy against visceral leishmaniasis by targetings *Leishmania donovani* topoisomerase IB. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 8-20. 2017. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/enfermeria/resource/pt/mdl-28174102>. Acesso em: 5 mai. 2020.
- SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J. D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious**

Diseases, v. 38, n. 9, 1266-1274. 2004. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127339>. Acesso em: 05 jan. 2018.

SOTO, J.; REA, J.; BALDERRAMA, M.; TOLEDO, J.; SOTO, P.; VALDA, L.; BERMAN, J. D. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 210-211. 2008. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256415>. Acesso em: 05 jan. 2018.

SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUKUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LOBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n.1-2, p. 421-431. 2018. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517318304162?casa_token=O6Q1KpwATj8AAAAA:JHY8EM7RWebJ3t4eGvFJMz6BpC4cOrIw3Dmlff_bKu8_rG0UeiUwz yt0602mI_fPYhP8t3Gc-H4. Acesso em: 1 ago. 2021.

SOUSA, R. M. F.; SILVA, T. A. R.; GUERRA, J. C. A. Tântalo: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, v. 24, n. 3, p. 343-346. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273476589_Tantalo_Breve_historico_propiedades_e_aplicacoes. Acesso em: 12 nov. 2021.

SOUZA, R. F. F. de. **Compostos de paládio(II) contendo acetofenonaóxima ortometalada: síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica**. 2017. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2017. Disponível em:

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/151865/souza_rff_dr_araiq_par.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Acesso em: 19 jun. 2020.

STEBOUNOVA, L. V.; GUIO, E.; GRASSIAN, V. H. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 233–244. 2011. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-010-0022-3>. Acesso em: 18 jul. 2020.

SUN, H. **Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth**. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2011. Disponível em: <https://www.wiley.com/en-us/Biological+Chemistry+of+Arsenic%2C+Antimony+and+Bismuth-p-9780470713907>. Acesso em: 19 jun. 2020.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733-740. 2007. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376078/>. Acesso em: 08 jan. 2018.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understand. **Open Biology**, v. 7. 2017. Disponível em:

<http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/royopenbio/7/9/170165.full.pdf>. Acesso: 03 jan. 2018.

SUNYOTO, T.; BOELAERT, M.; MEHEUS, F. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. **Expert Review of**

Anti-infective Therapy, v. 17, n. 1, p. 57-69. 2019. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30513027>. Acesso em: 22 abr. 2019.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 12, 2020**. Disponível em:
<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/27/Boletim-epidemiologico-SVS-13.pdf>.
 Acesso em: 03 maio 2020.

TAHGHIGHI, A. Importance of metals complexes for development of potential leishmanicidal agents. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 770, p. 51-60. 2014. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/265910319_Importance_of_metal_complexes_for_development_of_potential_leishmanicidal_agents. Acesso em: 19 jul. 2018.

TAPANELLI, S.; HABLUETZEL, A.; PELLEI, M.; MARCHIÒ, L.; TOMBESI, A.; CAPPARÈ, A.; SANTINI, C. Novel metalloantimalarials: Transmission blocking effects of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) phosphane complexes on the murine malaria parasite *Plasmodium berghei*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 166, p. 1–4. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27815977/>. Acesso em: 22 mai. 2020.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1 ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ. Editora Rio de Janeiro. 64p. 2013.

TELES, G.B.C.; SANTOS, A. P. A.; FREITAS, R. A.; OLIVEIRA, A. F. J.; OGAWA, G. M.; RODRIGUES, M. S.; PESSOA, F. A. C.; MEDEIROS, J. F.; CAMARGO, L. M. A. Phebotoxine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian with Peru and Bolívia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1678-8060. 2016. Disponível:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762016000700423&script=sci_abstract.
 Acesso em: 05 jan. 2018.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. **In Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry**. John Wiley- VCH: Weinheim, Germany, 2006.

TISATO, F.; MARZANO, C.; PERUZZO, V.; TEGONI, M.; GIORGETTI, M.; DAMJANOVIC, M.; TRAPANANTI, A.; BAGNO, A.; SANTINI, C.; PELLEI, M.; PORCHIA, M.; GANDIN, V. Insights into the cytotoxic activity of the phosphane copper(I) complex [Cu(thp)₄][PF₆]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 165, p. 80–91. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013416302021>. Acesso em: 22 mai. 2020.

TISATO, F.; MARZANO, C.; PORCHIA, M.; PELLEI, M.; SANTINI, M. Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 4, p. 708--749, 2010. DOI 10.1002/med.20174. Acesso em: 3 jan. 2020.

TUBEK, S.; GRZANKA, P.; TUBEK, I. Role of zinc in hemostasis: A review. **Biological Trace Element Research**, v. 121, n. 1, p. 1-8. 2008. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17968515>. Acesso em: 05 jan. 2018.

USGS, M. C. S. **Niobium (Columbium) and Tantalum Statistics and Information.**

Disponível em: <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/niobium/#links>. Acesso em: 3 jan. 2020.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n4/v80n4a15>. Acesso em: 14 set. 2017.

VAROL, M. The importance of metal-based drugs in medicinal inorganic chemistry to improve life quality of patients. **Journal of Applied Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 1000e107. 2016. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/293440378_The_Importance_of_Metal-Based_Drugs_in_Medicinal_Inorganic_Chemistry_to_Improve_Life_Quality_of_Patients. Acesso em: 10 jun. 2018.

VELÁSQUEZ, A. M. A.; RIBEIRO, W. C.; VENN, V.; CASTELLI, S.; CAMARGO, M. S.; ASSIS, R. P.; SOUZA, R. A.; RIBEIRO, A. R.; PASSALACQUA, T. G.; ROSA, J. A.; BAVIERA, A. M.; MAURO, A. E.; DESIDERI, A.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; GRAMINHA, M. A. S. Efficacy of a binuclear cyclopalladated compound therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis* and its inhibitory effect on topoisomerase 1B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e00688-17. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28507113/>. Acesso em: 2 jun. 2021.

VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A. DE; PASSALACQUA, T. G.; RIBEIRO, A. R.; SCOTRI, M.; CHIN, C. M.; ALMEIDA, L.; CISTIA, M. L. D.; ROSA, J. A.; MAURO, A. E.; GRAMINHA, M. A. S. Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1032–1039. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbchs/v27n6/0103-5053-jbchs-27-06-1032.pdf>. Acesso em: 1 out. 2020.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent developments in diagnosis and management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, p. 99-109. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs40257-015-0114-z.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2019.

WALDRON, K. J.; RUTHERFORD, J. C.; FORD, D.; ROBINSON, N. J. Metalloproteins and metal sensing. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 823-830. 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26736983_Metalloproteins_and_metal_sensing. Acesso em: 05 jan. 2018.

WHO. **Costs of medicines in current treatment of leishmaniasis.** 2010. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/research/978_92_4_12_949_6_Annex6.pdf?ua=1. Acesso em: 22 abr. 2019.

WHO. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development.** 2017. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255011/9789241565448eng.pdf;jsessionid=794C4CA8FD3D2E22495D0851308AA5?sequence=1>. Acesso em: 05 jan. 2018.

WHO. **World Health Organization. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals. A road map for neglected tropical diseases 2021–2030 Overview.** 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332094/WHO-UCN-NTD-2020.01-eng.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2021.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis.** 2021. Disponível em:
<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 23 jun. 2020.

ZIGMUNDO, G. C. O.; CRUZ, K. P.; HERPICH, T. L.; GABRIEL, K. U. H. L.; RIVERO, L. F. R.; MARTINS, M. A. T.; MARTINS, M. D. American Tegumentary Leishmaniasis: report of a case. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 3, p. e201. 2020. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212440320305873>. Acesso em: 23 set. 2020.

ZORODDU, M. A.; AASETH, J. CRISPONI, G. MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M. The essential metals for humans: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 120-129. 2019. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013418306846>. Acesso em: 23 abr. 2019.