

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

LILIAN PEREIRA FRANCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
COMPOSTOS ORGANOPALADADOS COM LIGANTES
NITROGENADOS E SUBSTITUINTES HALETOS E
PSEUDOHALETOS

Alfenas/MG

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

LILIAN PEREIRA FRANCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
COMPOSTOS ORGANOPALADADOS COM LIGANTES
NITROGENADOS E SUBSTITUINTES HALETOS E
PSEUDOHALETOS

Alfenas/MG

2010

LILIAN PEREIRA FRANCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
COMPOSTOS ORGANOPALADADOS COM LIGANTES
NITROGENADOS E SUBSTITUINTES HALETOS E
PSEUDOHALETOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos - Área 2.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques.

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida.

Alfenas/MG
2010

LILIAN PEREIRA FRANCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
COMPOSTOS ORGANOPALADADOS COM LIGANTES
NITROGENADOS E SUBSTITUINTES HALETOS E
PSEUDOHALETOS

A Banca Examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos - Área 2.

Aprovada em:

Profº.

Instituição:

Assinatura:

Profº.

Instituição:

Assinatura:

Profº.

Instituição:

Assinatura:

**À DEUS, porque D'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas,
Aos meus pais, Ciro e Ester pelo incentivo e amorosa dedicação em todos os
momentos,
Ao meu namorado Flávio, pelo amor, apoio e
compreensão às minhas ausências para a conclusão deste curso,
Ao meu irmão pelo carinho e
Aos meus familiares e amigos que sonharam junto comigo esta vitória.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG, especialmente a coordenadora Profa. Dra. Marília C. F. Ariosa pelo apoio e incentivo.

Aos Professores e colegas do Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ) em especial ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida e a amiga Elba.

A Ana Laura e Bárbara, no início apenas colegas, mas depois, grandes amigas. Ao João, obrigada pelo companheirismo e amizade.

Ao amigo Ivan, agradeço o seu auxílio durante a execução deste projeto.

Aos colegas de mestrado, que de tantos encontros na “salinha” tornaram-se verdadeiros companheiros nesses dois anos de caminhada.

Às funcionárias do laboratório de Biologia Molecular, Nereyda e Franciene pela amizade e colaboração.

Ao Prof. Adir e funcionários do Laboratório de Parasitologia, que me acolheram com carinho.

As agências de fomento: CAPES, FINEP, FAPEMIG, CNPq e UNIFAL-MG, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.”

(Augusto Cury, 2003)

RESUMO

Leishmaniose é uma doença causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. É considerada uma doença negligenciada, com altos índices em países em desenvolvimento. As opções de quimioterapia são limitadas e entre elas os problemas mais comuns são: a longa duração do tratamento, o alto custo, a resistência do parasito, a eficácia variável entre cepas ou espécies, os vários efeitos colaterais da droga e toxicidade. A necessidade de novos agentes terapêuticos seguros, efetivos e menos tóxicos é urgente. A co-infecção HIV/*Leishmania* tem aumentado ao redor do mundo, mudando a distribuição geográfica e a incidência da doença. O estudo da atividade de metais de transição tem sido realizado desde a descoberta da atividade antitumoral da platina (Pt) em 1965. Os complexos de paládio (II) têm se destacado especialmente por suas atividades biológicas variadas como antitumoral, atividade antiprotozoária, ação anti-inflamatória e atividade leishmanicida, além de apresentar menor toxicidade que a Pt. Devido à necessidade de novos agentes terapêuticos, doze novos complexos de paládio(II), obtidos a partir de dois ligantes iminicos, foram sintetizados e caracterizados por análise elementar, infravermelho (IR) e espectroscopia ^1H RMN. A avaliação *in vitro* dos ligantes e complexos foi realizada sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e sua citotoxicidade determinada em macrófagos murinos, através do teste MTT. A maioria dos complexos exibiram uma atividade leishmanicida que variou de 5,72-53,01 mg /mL para o IC_{50} . A atividade dos ligantes foi melhorada após a coordenação com o paládio e a substituição por alguns radicais aumentaram ainda mais a atividade leishmanicida. Os compostos mais ativos foram o complexo de cloreto (serie B) e os complexos de tiocianato (serie A e B). Os resultados observados indicaram que os novos compostos além de apresentarem uma potencial atividade leishmanicida possuem menor citotoxicidade e maior índice de seletividade ($\text{IS} > 1$) que a Pentamidina, droga de referência. Portanto, esses novos compostos são promissores agentes no tratamento contra a leishmaniose porém novas avaliações devem ser realizadas para determinação da toxicidade *in vivo* e mecanismo de ação.

Palavras-chave: Complexos de Paládio(II), Leishmaniose, Tratamento.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan from the genus *Leishmania*. It is considered a neglected disease with high endemicity in developing countries. The chemotherapy options are limited and the common problems are: long duration of therapy, high cost, parasite resistance, variable efficacy between strains or species, several drug side effects and toxicity. The need for new safe and effective therapeutic agents with less toxicity is urgent. The HIV/Leishmania co-infection has increased around of the world, changing the geographical distribution and the incidence of the disease. The study of transition metals activities has been conducted since the discovery of the antitumor activity of platinum (Pt) in 1965. The complexes of palladium (II) have been noted especially for its various biological activities as anti-tumor activity, anti-protozoal, anti-inflammatory action and leishmanicidal activity, and to be less toxic than the Pt. Due to necessity of new therapeutic agents, twelve new palladium (II) complexes obtained from two imine ligands were synthesized and characterized by elemental analyses, Infrared (IR) and ^1H NMR spectroscopies. The *in vitro* evaluation of ligands and complexes has been tested on promastigotes and amastigotes form of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and its cytotoxicity determinate on murine macrophages, by MTT test. Most complexes exhibited a leishmanicidal activity which ranged from 5,72-53,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for IC_{50} . The activity of ligands were improved after coordination with palladium and the replacement by some substituents had increased even more the leishmanicidal activity. The most active compounds were chloride (serie A) and thiocyanate complexes (both series). Besides the results indicated a potential leishmanicidal activity, the new compounds have lower cytotoxicity and higher selectivity index that Pentamidine, a drug reference. Therefore, these new compounds are promising agents in the treatment against leishmaniasis but further evaluation should be conducted to determine *in vivo* toxicity and mechanism of action.

Key-words: Palladium(II) complexes, Leishmaniasis, Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do protozoário <i>Leishmania</i>	10
Figura 2 - Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i>	11
Figura 3 - Estrutura química do antimonial pentavalente.....	17
Figura 4 - Estrutura química da anfotericina B.....	28
Figura 5 - Estrutura química da pentamidina.....	19
Figura 6 - Estrutura química da paromicina.....	19
Figura 7 - Estrutura química da miltefosine.....	20

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
1.1. Aspectos Gerais da <i>Leishmania</i> e leishmaniose.....	10
1.2. Tratamento.....	17
1.3. Pentamidina e outras Diaminas Aromáticas.....	21
1.4. Importância dos Metais.....	23
1.5. Possibilidade leishmanicida de fototerapia associada a metais.....	25
1.6. Compostos Organometálicos com atividade sobre DNA.....	26
REFERÊNCIAS.....	30
2. ARTIGO.....	41

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Aspectos gerais da *Leishmania* e Leishmaniose

O gênero *Leishmania* é constituído de várias espécies de protozoários pertencentes da família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida, que se caracterizam pela presença de uma estrutura extracelular rica em DNA, denominada cinetoplasto (LAINSON & SHAW, 1972). Em 1903, Leishman e Donovan separadamente descreveram um protozoário num tecido de baço, que hoje é chamado *Leishmania donovani* (HERWALDT, 1999). O parasito existe em duas formas: e a forma intracelular amastigota (FIGURA 1A), que é ovalada, não apresenta flagelo visível na microscopia ótica, é encontrada no interior dos fagolisossomos dos macrófagos do hospedeiro mamífero, onde sobrevivem e se multiplicam e a forma extracelular promastigota (FIGURA 1B), que é fusiforme, apresenta núcleo central e possui flagelo, organela relacionada à locomoção do parasito no tubo digestivo do inseto (CROFT & COOMBS, 2003).

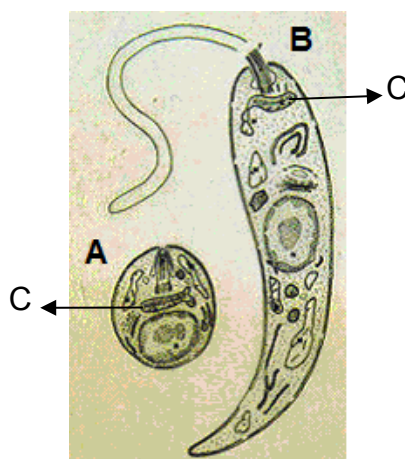


Figura 1: Formas evolutivas do protozoário *Leishmania*. A: amastigota; B: promastigota; C: cinetoplasto.

Fonte: www.dbbm.fiocruz.br/.../images/ciclo2a.jpg

As leishmanioses se caracterizam pelo parasitismo intracelular do sistema fagocitário mononuclear, a partir da picada do vetor flebotomíneo-fêmea infectado com as formas promastigotas de *Leishmania* que, após inoculação no hospedeiro

vertebrado se transformam em amastigotas no vacúolo parasitóforo de macrófagos (LAINSON & SHAW, 1992).

Seu ciclo envolve hospedeiro vertebrado como os mamíferos (canídeos, roedores e o homem) e répteis, e invertebrados, o vetor *Phlebotomus spp.* (Velho Mundo), e *Lutzomyia spp* (Novo Mundo) (VILLINSKI et al., 2008), conforme demonstrado nas etapas da Figura 2. O vetor é infectado por formas promastigotas quando se alimenta de sangue contaminado (animal hospedeiro-reservatório ou o próprio homem) contendo macrófagos que possuem amastigotas no seu interior. Após a lise do macrófago infectado as amastigotas transformam-se em promastigotas, as quais aderem às microvilosidades do intestino médio do inseto. Nesta fase, os parasitos são denominados procíclicos, e caracterizam-se por se multiplicarem rapidamente por divisão binária, transformando-se, após alguns dias em promastigotas metacíclicos, que são muito móveis e não têm a capacidade de se dividir. Os promastigotas metacíclicos, infectantes, migram para a probóscida do inseto e são injetados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (BATTES, 1994).

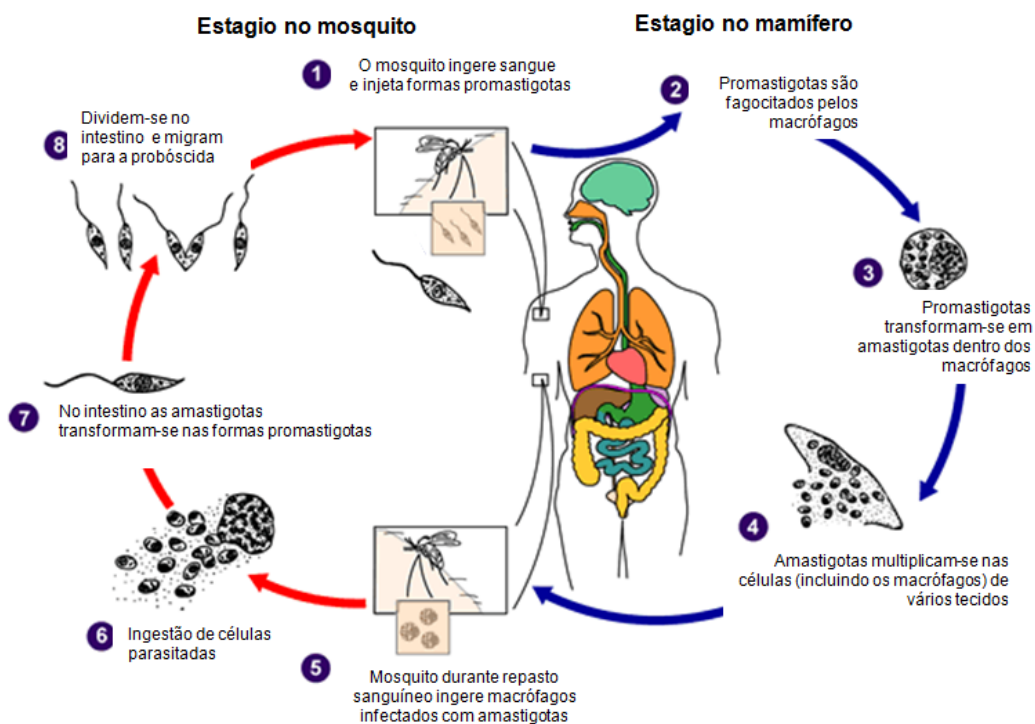


Figura 2. Ciclo evolutivo da *Leishmania*.

Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Durante o repasto sanguíneo as formas promastigotas do parasito, via probóscida do mosquito, infectam o hospedeiro vertebrado. Estas formas são ingeridas pelos macrófagos onde ocorre sua transformação em formas amastigotas que se reproduzem por divisão binária até que a célula se rompa e infecte outras células fagocíticas continuando assim o ciclo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Leishmania (Leishmania) spp.* e *Leishmania (Viannia) spp.* Os parasitos do subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior (secção peripilária). Os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio (secção suprapilária) (LAINSON & SHAW, 1992). Já foram descritas aproximadamente 21 espécies de leishmania que podem infectar o homem e pelo menos 30 espécies do mosquito transmissor flebotomíneo (DESJEUX, 1996; HERWALDT, 1999).

A Leishmaniose possui como característica a diversidade de manifestações clínicas e pode ser classificada em duas formas principais: leishmaniose visceral (LV), a forma mais severa, também conhecida por Calazar, caracteriza-se pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de peso e febre, geralmente fatal quando não tratada; e leishmaniose cutânea (LC), que se apresenta por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; a forma cutânea difusa, com lesões nodulares persistentes no corpo inteiro pode ter cura espontânea, porém quando as lesões são múltiplas causa desfigurações que prejudicam o indivíduo (DESJEUX, 2004).

A doença geralmente se manifesta depois de várias semanas ou meses após a infecção dependendo da resposta imune do hospedeiro e as propriedades de virulência da espécie infectante. Existe uma relação de dependência de complexas interações entre o parasito e o hospedeiro vertebrado, que determinam a apresentação clínica e o curso evolutivo das leishmanioses (HARKER, 1992).

As principais manifestações clínicas da forma visceral são febre, tosse, dor abdominal, diarreia, epistaxe, esplenomegalia, hepatomegalia, caquexia e pancitopenia (GUERIN et al 2002; DAVIDSON, 2005). A LV pode apresentar-se assintomática a que evidencia os fatores de suscetibilidade do hospedeiro como

idade, estado nutricional e resposta imune (MURRAY et al. 2005). Grande parte da Leishmaniose Visceral na Índia e no leste da África é causada pela *Leishmania donovani*, na região do Mediterrâneo *L. infantum* e no Novo Mundo a *L. chagasi* e *L. amazonensis* (GUERIN et al., 2002; WHO, 2005).

Herwaldt relatou a existência de variações da leishmaniose visceral e cutânea. Na leishmaniose visceral existe a variação leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), uma leishmaniose cutânea crônica (DESJEUX, 2004) que se desenvolve depois da melhora da forma visceral. A LDPC pode estar associada com uma forma recidivante da doença visceral e se manifesta por diversos tipos de lesões na pele, predominantemente na face. Os indivíduos com LDPC podem servir como hospedeiros reservatórios de infecção (HERWALDT, 1999).

A leishmaniose cutânea pode ser causada pelas seguintes espécies no Velho Mundo *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. infantum* e *L. donovani*; e no Novo Mundo *L. major*, *L. chagasi* e espécies do complexo *L. mexicana*, especialmente *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* e as espécies do subgênero *Viannia* [*L. (V.) braziliensis*, a *L. (V.) panamensis*, a *L. (V.) guyanensis* e a *L. (V.) peruviana*]. As variações de leishmaniose cutânea são a leishmaniose muco-cutânea (LMC), cutâneo-difusa (LCD) e a leishmaniose recidiva.

A LMC pode ser causada pelas espécies do subgênero *Viannia* especialmente pela *L. (V.) braziliensis*, mas também pela *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* e *L. amazonensis*, caracteriza-se por lesões tardias que surgem após a cura de uma lesão cutânea (WALTON, 1987), causa mutilações, começando com úlceras na pele que abrangem especialmente nariz e boca (DESJEUX, 2004).

A LCD, causada pela *L. aethiopica* (Velho Mundo) e espécies *L. mexicana* (Novo Mundo), é uma doença crônica, progressiva, poliparasítica variante, de longa permanência e difícil tratamento devido à deficiência na resposta imune celular mediada, se manifesta por lesões de pele papulosas ou nodulares deformantes não-ulcerativas que se distribuem amplamente na superfície corporal onde se encontram macrófagos em abundância repletos de formas amastigotas (WALTON, 1987; DESJEUX, 2004).

A leishmaniose recidiva, doença crônica, hiperérgica tipicamente manifestada por uma única lesão facial que aumenta com o passar dos anos, geralmente é

causada pela *L. tropica* e *L. major* e pode ser encontrada no Irã e Iraque e regiões próximas (HERWALDT, 1999).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi identificada no Brasil pela primeira vez em 1895, a qual representa uma protozoose que tem como principal agente etiológico a *Leishmania Viannia braziliensis* (SAMPAIO, 2002). Caracteriza-se por apresentar lesões cutâneas, geralmente ulcerosas, associadas com comprometimento da mucosa oronasal, por isso foi denominada leishmaniose tegumentar por abranger tanto a forma cutânea como a forma mucosa da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). De acordo com o Ministério da Saúde, (2005), atualmente são reconhecidas dez espécies que causam a doença *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffii*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsonii*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (L.) mexicana* e *Leishmania (L.) venezuelensis*.

A leishmaniose (visceral e cutânea) é considerada no Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, como a sexta doença infecciosa com maior incidência confirmada. O número de casos anuais de leishmaniose tegumentar passou de 4.560 a 28.712, no período de 1980 a 2004. Aumento ainda mais expressivo foi registrado em relação à leishmaniose visceral, com 163 casos em 1.980 e 3.366 casos em 2004. A expansão na distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no Brasil também é bem evidente, pois em 1994 havia registro de casos autóctones em 1861 municípios, distribuídos entre 20 estados da federação. Em 2002, observou-se expansão da doença para 2.302 municípios, distribuídos por todos os estados. As regiões nordeste e norte são as de maior incidência, seguidas pela região centro-oeste, sudeste e sul (MS/FUNASA, 2002).

A *Leishmania* Visceral é prevalente em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Estes países juntos somam 90% da leishmaniose visceral de todo mundo. Estima-se 500.000 novos casos por ano com uma taxa de mortalidade de 59.000 (DESJEUX, 2004). Estima-se cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea, mais de 90% localizados no Afeganistão, Argélia, Iran, Iraque, Arábia Saudita e Síria e no Brasil e Peru. Entretanto a distribuição geográfica dos casos de leishmaniose tem sido alterada devido à migração das áreas rurais para as áreas urbanas, de novos trabalhadores (estrangeiros) para áreas endêmicas, refugiados de guerras civis como no leste da África e viajantes (HERWALDT, 1999;

SCHWARTZ, HATZ & BLUM, 2006).

Os casos de LV na América Latina são descritas em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, predominantemente na região Nordeste. A doença possui uma correlação com a pobreza, acometendo as classes com baixos recursos financeiros em regiões com serviços de saúde precários (ALVAR, 2006). No Brasil foi demonstrado um aumento na incidência e letalidade desta doença entre 1994 a 2004, principalmente em indivíduos não tratados e em crianças desnutridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; MALAFAIA, 2008).

Diagnósticos incorretos, variações de resposta do hospedeiro, afecções inaparentes, subnotificações, são algumas das causas para a dificuldade em se estabelecer a real prevalência da leishmaniose (MARZOCHI, 1992; BERMAN, 1997).

O diagnóstico da leishmaniose pode ser realizado através de testes parasitológicos e sorológicos. Os testes parasitológicos são positivos quando na microscopia encontram-se formas amastigotas em lâminas coradas por Giemsa ou Leishman. Outro teste parasitológico é feito por meio da observação da mobilidade de formas promastigotas em culturas isoladas após 2 semanas. Na LV a observação pode ser realizada na microscopia de aspirados de baço, fígado e linfonodos (DAVIDSON, 2005). Pode-se preparar cultura de biópsias de pele nas LC e LCPC e lesões da mucosa na LMC. Os testes imunológicos usados são aglutinação direta, teste de anticorpo imunofluorescente e ELISA. A hipersensibilidade tardia no teste de Montenegro é muito útil nas formas de leishmaniose cutânea e muco-cutânea, porém geralmente se mostra negativa nas formas cutâneo-difusa e visceral. Técnicas moleculares como a PCR (reação em cadeia de polimerase) também são usadas podendo auxiliar na identificação e quantificação de leishmania, porém possuem alto custo (DAVIDSON, 2005). Modificações nas técnicas com PCR estão sendo testadas, como um método relatado por Spanakos e colaboradores (2008), capaz de detectar o parasita diretamente de amostras de sangue de pacientes com LV.

A incidência da leishmaniose tem aumentado devido a alguns fatores como: o aumento de viagens internacionais (viajantes, soldados), a alteração do habitat do vetor, o aumento da patogenicidade ou da transmissão de doenças como HIV (SCHWARTZ, HATZ & BLUM, 2006)

O grande interesse na doença nos últimos anos é devido ao aumento do

número de infectados, principalmente no caso de migrações (para áreas endêmicas) e de pacientes com AIDS. O parasito, através do seu ciclo de vida, desenvolveu um mecanismo único de adaptação que assegura sua sobrevivência ao meio, tanto no sistema digestivo do vetor quanto no sistema imune do hospedeiro vertebrado, inibindo o mecanismo de defesa celular deste (CUNNINGHAM, 2001).

A co-infecção leishmania x AIDS tem sido relatada em todas as partes do mundo, e há uma preocupação quanto esta associação (MORENO et al., 2000; TOMAS, 2000; REMME, 2002). Desde o começo da epidemia global de HIV, anualmente os números de casos de leishmaniose associada com o vírus tem aumentado. Co-infecção com HIV pode ativar infecções latentes de leishmania, aumentando assim o nível de transmissão da leishmaniose (MOLINA et al., 2003). Sampaio e colaboradores (2002) relataram alguns casos de co-infecção Leishmaniose/AIDS no Brasil. Ambos os agentes infecciosos compartilham o mesmo alvo celular. *Leishmania* infecta e se multiplica dentro de macrófagos e o HIV também invade e se replica nas mesmas células, além das células T CD4 (CRUZ et al., 2006). A presença desses numa mesma célula pode causar implicações importantes na expressão e distribuição dessas doenças. A imunodepressão induzida pelo HIV na infecção viral tende a predominar sobre resposta celular causada pelo parasito, implicando na capacidade de reconhecimento da *Leishmania* pelas células (OLIVER et al., 2003).

As principais estratégias para o controle da doença consistem na busca de pessoas infectadas, o seu tratamento, o controle do vetor e dos hospedeiros reservatórios (DESJEUSX, 2004). Maigon e colaboradores (2007) relatam a importância no controle do vetor flebotomíneo devido a sua participação na adaptação do parasito, sua sobrevivência, diferenciação e transmissão no hospedeiro vertebrado. A eliminação de reservatórios e a campanha antivetorial são medidas de controle que poderiam proteger os indivíduos de áreas com risco de infecção. No entanto, todas essas medidas são de aplicação limitada nas leishmanioses por diversos motivos, entre os quais podemos destacar (a) a variedade de vetores e reservatórios que mantêm o ciclo de transmissão, mesmo na ausência de infecção humana; (b) dificuldade no controle vetorial; (c) falta de medicamentos eficazes; (d) elevado grau dos efeitos colaterais causados pelos medicamentos preconizados atualmente e (e) dificuldade no diagnóstico das

leishmanioses que podem ser confundidas com muitas doenças tropicais.

1.2. Tratamento

O tratamento das leishmanioses é limitado, principalmente em função das poucas drogas terapêuticas disponíveis com alguma eficácia comprovada, as quais são na sua grande maioria de aplicação injetável (GUERIN et al., 2002). Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral do Ministério da Saúde (2005), a droga de primeira escolha para o tratamento são os compostos pentavalentes antimoniais. Existem também as drogas de segunda linha como a anfotericina B, anfotericina B lipossomal, paromicina, aminosidina tópica, miltefosine, interferons, cetoconazol e itraconazol, e pentamidina.

No Brasil, os compostos antimoniais, sob a forma de sais trivalentes, foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1913 por Gaspar Vianna. Na década de 40, os antimoniais pentavalentes, Sb(V), foram introduzidos na terapia médica por apresentarem efeitos colaterais e toxicidade reduzidos, quando comparados à forma trivalente. Atualmente, os derivados pentavalentes são considerados a primeira opção para o tratamento das leishmanioses, podem ser administrados via intramuscular ou intravenosa e estão disponíveis em duas formulações, o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (FIGURA 3) e o antimoniato-N-metil glucamina ou meglumine (Glucantime®) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

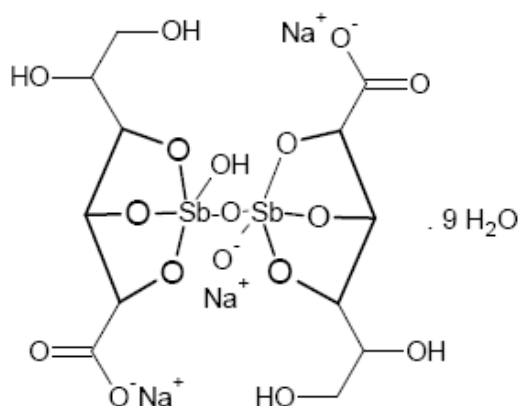


Figura 3. Estrutura química do antimonial pentavalente Pentostam® (estibogluconato sódico).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não está bem esclarecido, mas há evidências de que poderiam agir desencadeando apoptose (SERENO et al., 2001). O uso em gestantes, portadores de cardiopatias, nefropatias e hepatopatias é contra-indicado (MS, 2002). O tratamento, geralmente hospitalar, requer repetidas doses; sua duração pode ser de 28 dias para LV ou de 20 dias para LMC e casos não complicados de LC. No entanto, o aumento da incidência de leishmaniose e a co-infecção-AIDS podem estar relacionados à resistência na melhora clínica. A resistência aos antimoniais já apresenta índices de 1% em pacientes da África e mais de 70% na Índia. Adicionalmente, o tratamento apresenta efeitos colaterais, entre os quais podemos incluir pancreatite (mais severa em pacientes HIV-positivo), leucopenia, arritmias, antralgia e mialgia, trombocitopenia, letargia, anorexia, dor de cabeça, náuseas, vômitos, paladar de sabor metálico, falência renal, artrite e tremor (DAVIDSON, 2005).

Na Índia, onde a resistência aos pentavalentes é mais comum, a Anfotericina B (FIGURA 4) é um poderoso agente anti-leishmanicida de primeira linha. O tratamento requer hospitalização e monitoração laboratorial durante um mês. É eficaz contra leishmaniose muco-cutânea, a qual não possui boa resposta ao tratamento com os antimoniais. Sua via de administração é intravenosa e a dose está no limite da toxicidade, apresentando efeitos como anafilaxia, trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, disfunção renal, entre outros (KHAW & PANOSIAN, 1995).

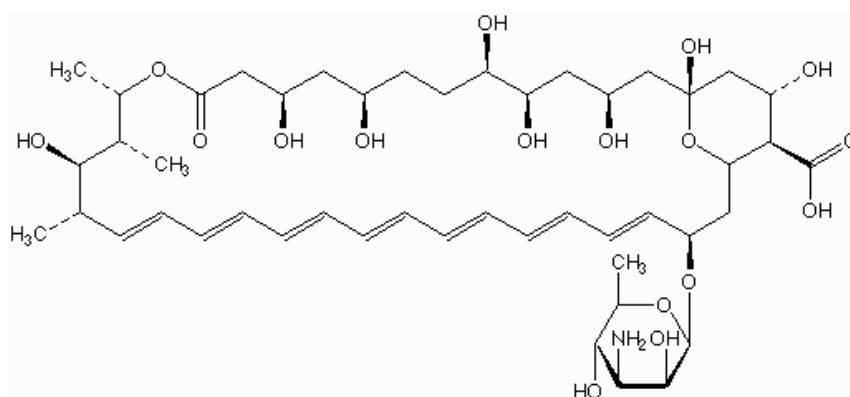


Figura 4. Estrutura química da anfotericina B

Seu mecanismo de ação consiste na alteração da permeabilidade seletiva da membrana através da formação de poros, o que leva a morte celular. A anfotericina B lipossomal, (Ambisome[®]), demonstra efetividade, ação rápida, maior tolerância e

menor toxicidade, porém possui alto custo, mas tem sido usada em pacientes resistentes aos antimoniais ou em pacientes HIV-positivo intolerantes a estes (GUERIN et al., 2002; DAVIDSON, 2005).

Por sua vez, a Pentamidina (FIGURA 5), é uma diamina aromática com ação limitada devido sua toxicidade, normalmente utilizada como droga de segunda linha quando antimoniais não se mostram eficazes, porém na Índia já foi demonstrado um aumento na sua resistência frente à doença (GUERIN et al., 2002). Seu mecanismo de ação ainda é incerto, mas seus efeitos sobre o parasito incluem ligação ao DNA do cinetoplasto (CROFT & COOMBS, 2003) sendo a proposta mais aceita, a inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al, 2005).

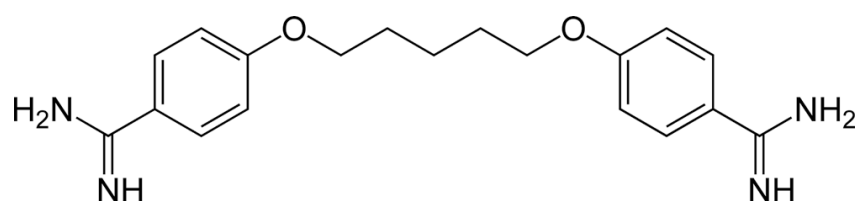


Figura 5. Estrutura química da pentamidina.

Um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, a Paromicina (FIGURA 6), também conhecido por Aminosidina tem demonstrado atividade efetiva contra LV e pode ser combinada com antimoniais pentavalentes, sendo as 2 drogas injetadas em diferentes locais de aplicação. Estudos na fase clínica ainda não estão completamente concluídos, mas sabe-se que por via parenteral pode causar ototoxicidade, gerando problemas de controle motor e do equilíbrio (GUERIN et al., 2002). Aminosidina tópica de 15% em cloridrato de metilbenzetônio é efetiva na leishmaniose cutânea causada por *L. major* (DAVIDSON, 2005).

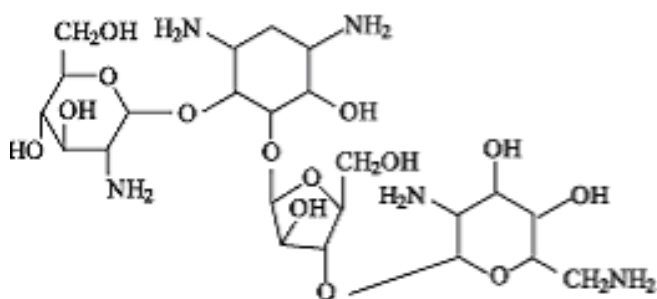


Figura 6. Estrutura química da paromicina.

Alternativamente, a Miltefosine (Impavido®, Figura 7), uma droga anticâncer alquilfosfolipídica usada desde a década de 80 tem se mostrado uma nova promessa no tratamento das leishmanioses. Apesar de não ser o composto mais ativo contra parasitos da *Leishmania* em testes *in vitro* e *in vivo* foi identificado como um dos mais recentes agentes de uso oral usados no tratamento da leishmaniose (CROFT & ENGEL, 2006). Esta droga foi testada no Novo Mundo, mas sua eficácia foi variável quando utilizada em leishmaniose mucocutânea, causada pelo parasito do subgênero *Viannia* (HERWALDT, 1999). Os mecanismos de ação da miltefosina contra a *Leishmania* ainda não são bem entendidos. Sabe-se que esta droga é capaz de bloquear a síntese e alterar a composição da membrana do parasita. A dose preconizada para adultos é 100 mg por dia, por 28 dias. Seu uso já está licenciado contra as leishmanioses visceral e cutânea. Não pode ser administrado a mulheres grávidas por ser teratogênica e apresenta os seguintes efeitos colaterais: náuseas, vômitos, diarreia e pode causar insuficiência renal (DAVIDSON, 2005).

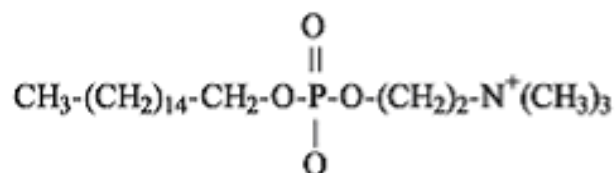


Figura 7. Estrutura química da miltefosine.

Por sua vez, o Interferon, um imunomodulador biológico estudado desde 1980, pode promover a atividade dos antimoniais no tratamento de LV e LC suprimindo o sinal de inibição entre macrófagos e células T causado pela infecção. Alguns exemplos de imunomoduladores são imidazoquinolina e imiquimode (*imiquimod*); possuem alto índice de cura, mas seu alto custo os exclui (CROFT & COOMBS, 2003).

Já o Cetoconazol e o Itraconazol têm se mostrado efetivos contra leishmaniose cutânea causada pela *L. major* ou *L. mexicana* e pouco ativos contra *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. braziliensis*. Todavia, possuem efeitos colaterais como ginecomastia, diminuição da libido, teratogenicidade e hepatotoxicidade, que deve ser periodicamente acompanhada durante o tratamento (BALANÃ-FOUCE et al., 1998).

Há mais de 20 anos a TDR (Tropical Disease Research - Pesquisa de doenças Tropicais) apoiada pela Organização Mundial de Saúde tem financiado pesquisas na produção de vacinas (WHO, 2005). Atualmente, ainda não há disponível uma vacina efetiva contra as leishmanioses devido às inúmeras dificuldades como: a diversidade antigênica, o número de espécies que afetam os seres humanos, a variedade de reservatórios e vetores e as diferentes formas clínicas da doença.

De acordo com o Ministério da Saúde (2005) existe uma vacina contra a leishmaniose visceral canina registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, porém sem constatação de seu custo-benefício e efetividade para o controle de reservatório da leishmaniose visceral canina em programas de saúde pública. Dentre as ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, as relacionadas ao reservatório doméstico (cão) são consideradas as mais polêmicas, devido à indicação da eutanásia de cães infectados e a contra-indicação do tratamento canino como ferramentas para bloqueio da transmissão vetorial.

No Brasil, os surtos descritos na literatura estão associados com a presença de cães soropositivos (RESENDE, 2007). Em várias regiões geográficas a epidemia canina precedeu a epidemia humana (CAMARGO-NEVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001). Há evidências de que animais tratados mantêm a capacidade de infectar os insetos flebotomíneos. Diante desses fatos a Secretaria de Vigilância e Saúde (2009), considera que o tratamento canino representa risco para a saúde pública, podendo o reservatório de cães tornar-se um risco à população com possibilidade de desenvolver resistência de parasitos contribuindo para a disseminação da doença (SILVA et al, 2001; MIRET et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

A pesquisa por novos agentes terapêuticos tem como princípio obter um composto que apresente alta seletividade de ligação com seu alvo farmacológico, seja tóxico para o parasita, porém não cause danos às células humanas hospedeiras. Uma estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade leishmanicida é através da identificação das diferenças metabólicas e bioquímicas entre hospedeiro e o parasito tornando-se um alvo para drogas. (SANTOS, 2004; SHUKLA et al, 2009).

1.3. Pentamidina e outras Diaminas Aromáticas

As diaminas aromáticas tiveram seu uso iniciado no tratamento da leishmaniose em 1939 com a pentamidina, considerada a primeira droga estável com menor toxicidade e administrada pela via intramuscular ou endovenosa. Atualmente é usada em casos clínicos não responsivos aos antimoniais pentavalentes. É considerada droga de segunda linha e apresenta efeitos colaterais como taquicardia, náuseas, vômitos, dor de cabeça, hipotensão, nefrotoxicidade: hiperglicemia, podendo causar diabetes, hipotensão, e outros efeitos tóxicos como trombocitopenia, anemia, neutropenia e indução de enzimas hepáticas (BALANÃ-FOUCE et al., 1998; HATH et al, 2003).

A pentamidina apresenta uma atividade clínica significativa, entretanto, há um aumento na sua resistência, principalmente na Índia (DAVIDSON, 2005). O seu modo de ação ainda não está completamente elucidado, há evidências de ligação ao DNA na atividade biológica de derivados da diamina. Conforme modelo descrito por Athri e colaboradores (2006), há formação de um complexo na fenda menor da sequência de DNA ricas em adenina e timina (*minor groove* AT) que altera a ação de uma ou mais enzimas na transcrição do DNA. A interação das diaminas com DNA, ocorre através de uma ligação reversível da droga à superfície do *minor-groove* AT do DNA do cinetoplasto e cromossomal (BALANÃ-FOUCE et al., 1998). Na *Leishmania*, o DNA do cinetoplasto é o alvo inicial das diaminas. A interação com ácidos nucleicos causa uma alteração na estrutura terciária e conseqüentemente inibe a replicação, transcrição ou ambas (GAROUFIS.; HADJIKAKOU.; HADJILIADIS, 2009).

Outros mecanismos de ação também são propostos pela pentamidina no cinetoplasto do parasita como a inibição de proteases de serina (MORTY et al., 1998), a perturbação no metabolismo poliamina (CALONGE et al., 1996) e a inibição da Topoisomerase II.

As topoisomerases (TOPs) são consideradas como um novo alvo para futuras drogas antitripanosomatídeas, pois atuam em vários aspectos do metabolismo dos ácidos nucleicos e estão envolvidas com a diminuição da tensão torsional da rede de DNA do cinetoplasto, quebrando-a e formando mini-círculos, processo este que ocorre antes da replicação (SHAPIRO, 1994; CHEESMAN, 2000; DAS et al., 2006).

Estudos recentes mostraram diferenças nas interações entre as TOPs humanas e do parasita. A ação citotóxica da pentamidina foi demonstrada mediante

a inibição da enzima topoisomerase II, que desencadeia o processo programado de morte celular (*programmed cell death process*), ou também chamado de apoptose, um processo regulado geneticamente para o “suicídio” da célula. O fenômeno da indução da apoptose causado por uma droga vem sendo estudado devido sua extrema importância para a evolução da terapêutica (JEAN-MORENO, 2006; SINGH & DEY, 2007).

As diaminas são compostos de grande interesse para o desenvolvimento de novos fármacos de ação antiparasitária. Os trabalhos recentes relatam uma pró-droga sintética com efeito oral e menor toxicidade que a pentamidina, denominada furamidina, que está na fase 3 dos testes clínicos contra a *Trypanosoma brucei gambiense* (ATHRI et al., 2006, SILVA et al., 2007). Novos compostos derivados diamínicos testados por Costa e colaboradores (2009) apresentaram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas das cepas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*.

Como uma estratégia para a formação de uma nova droga leishmanicida, com maior poder de ação e menor efeito tóxico, combinações com complexos organometálicos têm sido testados, como foi relatado por MBONGO e colaboradores (1998) que testaram o sinergismo do complexo de Iridio ligado à pentamidina.

1.4. Importância dos Metais

A Química Inorgânica Medicinal teve suas origens nos trabalhos de Paul Ehrlich, prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1908. Fundador da quimioterapia introduziu as primeiras idéias sobre relações estrutura-atividade e o conceito de índice terapêutico, que utilizou em complexos metálicos. Os seus primeiros estudos, relacionando a estrutura à atividade, foram feitos para compostos inorgânicos de arsênio (BERALDO, 2005). Alfred Werner, considerado o pai da Química de Coordenação pelo desenvolvimento de sua teoria para explicar a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos de cobalto, foi o primeiro químico inorgânico a receber um prêmio Nobel de Química em 1913 (BERALDO, 2005).

O uso dos metais na medicina vem sendo praticado há aproximadamente 5000 anos. Os egípcios usavam cobre para esterilizar a água 3000 anos a.C. e o ouro eram empregados na fabricação de medicamentos na Arábia e na China há 3500

anos, mais em razão da natureza preciosa do metal do que de suas propriedades medicinais (THOMPSON & ORVIG, 2003). Dentre os demais usos dos metais na medicina encontram-se os antiácidos que utilizam os metais como alumínio, bismuto, os alcalino terrosos como cálcio e magnésio, na forma de carbonatos, hidróxidos, silicatos e óxidos que neutralizam o excesso de ácido através da lenta liberação de base no estômago (AIROLDI, 1994.), antidiabéticos utilizando vanádio, zinco e cobre (YOSHIKAWA et al., 2009), o carbonato de lítio no tratamento do transtorno bipolar (FARIAS, 2005).

A atividade de compostos metálicos no tratamento de doenças infecciosas é relatado desde a antiguidade. Atualmente tem sido descrito metais com atividades biológicas como: lantânio(II), gadolínio(II) e paládio(II) com atividade antibactericida contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, o tratamento da sífilis utilizando compostos à base de arsênio, platina, paládio e rutênio sendo utilizados como antiparasitários contra Doença de Chagas (VIEITES et al., 2009), o ouro utilizado no tratamento de artrite (SHRIVER, 2008).

Nos últimos anos ocorreu um aumento no estudo dos metais e de seu papel no organismo. O papel das metaloproteínas na saúde humana e nas doenças tem direcionado estudos em direção à Química Bioinorgânica. Ferro, zinco e cobre são os metais de maior concentração encontrados no corpo humano. A deficiência de algum deles pode acarretar sérias complicações, por exemplo, o Zinco, que está envolvido em varias funções enzimáticas incluindo transcrição e regulação do DNA, oxidação e hidrólise, quebra de ligações peptídicas como também na formação de ligações fósfoliesteres. Proteínas ligadas ao zinco tem sido estudadas como um novo alvo terapêutico contra o câncer por participarem de funções biológicas como maturação, regulação de degradação de proteínas, regulação no nível de hormônios e no controle do ciclo celular. Algumas organelas também são potenciais alvos terapêuticos, como a mitocôndria que possui como função a regulação na produção de energia, no metabolismo, nas reações redoxes e na morte celular programada (FARREL, 2002). Em situações de excesso de íons metálicos, agentes quelantes são utilizados para tratar intoxicação endógena (Doença de Wilson (Cu) ou Talassemias (Fe)) ou exógena (pela ingestão) (AIROLDI, 1993).

Os metais possuem uma característica que os torna importantes como componentes (funcionais e estruturais) dos seres vivos, é a sua propensão em

perder elétrons formando íons com cargas positivas enquanto as biomoléculas como proteínas e DNA são ricas em elétrons. Essa atração entre cargas opostas conduz a uma interação entre íons metálicos com moléculas biológicas.

Há inúmeras possibilidades de formar estruturas diferentes devido aos variados números de coordenação (CASTILLO-BLUM, 2000). Essa diversidade é acrescida pela associação de diferentes metais, ligantes e tipos de reações. Na literatura tem sido descrito a síntese de novos compostos pelas reações de adição ou substituição por grupos radicalares como haletos ou pseudohaletos (grupos cujas propriedades são análogas aos átomos de halogênio). De modo distinto, esses grupos demonstraram diferentes atividades biológicas, como é descrito por Tripathi e colaboradores (2006) sobre a atividade antimicrobiana do tiocianato, e o aumento da atividade antitumoral de complexos paladados após substituição pelo haleto bromo relatado por Moro e seu grupo (2009).

1.5. Possibilidade leishmanicida de fototerapia associada a metais

A possibilidade de combinação entre droga luz-drogas, para matar microorganismos foi descoberto a mais de 100 anos. (MOAN et al., 2003). Esta nova modalidade terapêutica é chamada de Terapia Fotodinâmica (TFD), oficialmente reconhecida no Canadá, Japão, Estados Unidos e em alguns países da Europa. TFD consiste na administração de um agente fotossensibilizante, por diferentes vias, e sua subsequente ativação pela luz para produzir espécies reativas de oxigênio que destroem seletivamente o tecido alvo. O direcionamento da ação é baseado na localização preferencial do fotossensibilizante nos tecidos e na aplicação da luz apenas na região de interesse. Desde então, este novo modelo de terapia estava sendo usado preferencialmente no tratamento de tumores cujas principais vantagens frente às outras técnicas de tratamento de tumores estão relacionadas principalmente ao seu caráter relativamente não-invasivo, quando comparado a cirurgia, ao direcionamento preciso, a segurança na administração repetida em relação a radioterapia (DEROSA, 2002; NOWIS, 2005). Além do uso no tratamento antitumoral, TFD tem sido utilizado em outros tipos de tratamento como no dermatológico contra alopecia, acne, psoríase, bactéria e estética (MITRA, STABLES, 2006; BUGGIANI et al., 2008).

O tratamento de infecções por agentes intracelulares é um desafio tanto na área de saúde quanto na área econômica. Muitos microrganismos utilizam o interior das células como refúgio contra defesa celular do organismo, o que dificulta o acesso de agentes quimioterápicos. Esse obstáculo pode promover uma seleção de mutantes resistentes (AKILOV, 2006).

O uso da TFD concentrava-se em patógenos extracelulares e muitos estudos foram realizados confirmando atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Devido à inespecificidade de sua ação “tóxica”, a capacidade dos microrganismos em desenvolver resistência é menor (AKILOV, 2006).

Recentemente pesquisa na área da fototerapia tem realizado testes contra parasitos intracelulares como *Leishmania* entre outros, evidenciando a associação entre a TFD e complexos metálicos (GARDLO, 2003; SOUZA, 2006). Os resultados obtidos do teste realizado por Bristol e colaboradores (2006) sugerem a possibilidade de usar a FTD em macrófagos infectados com *Leishmania* minimizando os danos ao tecido.

1.6 Compostos Organometálicos com atividade sobre DNA

Uma categoria de compostos contendo metais na estrutura, os organometálicos, tem sido objeto de recentes estudos. Estes compostos possuem a habilidade em adquirir diversas formas estruturais através de variados modos de ligação promovendo uma propriedade físico-química capaz de intermediar a coordenação dos compostos e as moléculas orgânicas (ALLARDYCE, 2005 apud DORCIER et al., 2008). A estabilidade do complexo é determinada por diversos fatores como estados de oxidação do metal, a biomolécula e geometria de coordenação, estrutura tridimensional do complexo formado, estequiometria e disponibilidade das biomoléculas para coordenação (BENITE et al. 2007). Sua ação sobre o DNA foi descoberta na década de 60, quando Lerman descobriu que tinturas de acridina eram capazes de se ligar aos ácidos nucleicos pela sua inserção entre as bases de pares de polinucleotídeos por interações não covalentes (LERMAN, 1961; BIVER, SECCO, VENTURINI, 2008). Este processo foi chamado de intercalação, que demonstrou a capacidade de alterar profundamente a estrutura secundária do nucleotídeo (BIVER, SECCO, VENTURINI, 2008).

As evidências sobre os danos causados pela a ação de metais sobre o DNA foram comprovadas e relatadas em vários artigos, como a atividade anticâncer citada por Gastaldo e colaboradores (2008). Todavia, mesmo tendo ação comprovada sobre os ácidos nucléicos, poucos metais foram testados (LIU et al., 2007). BRUIJNINCX and SADLER, (2008) ressaltam a importância dos compostos organometálicos para o campo da medicina através da pesquisa de novas interações com o DNA.

A interação entre complexos com metais de transição e o DNA tem sido estudada por mais de décadas como promissores agentes terapêuticos. Os metais intercaladores de DNA, através de interações com os ácidos nucléicos, podem alongar a fita de DNA causando uma alteração na sua estrutura secundária. A interação, covalente ou não-covalente, entre os metais e a dupla-hélice do DNA pode ocorrer na forma de três ligações: intercalação, ligação na fenda (*groove binding*) e efeitos externos eletro-estático (LIU et al., 2007). Liu e colaboradores (2004) citam vários exemplos de complexos metálicos (di e multi-nuclear) capazes de provocar a hidrólise do DNA com ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), praseodímio (Pr), cério (Ce), lantânio (La) e cobalto (Co).

Em 1965, Rosenberg descobriu as propriedades anti-tumorais da cisplatina (cis-diaminodichloroplatino(II)). Desde então análogos de complexos de platina e paládio estão sendo estudados (ROSENBERG, 1965; CORBI et al., 2007). A platina é um elemento químico pertencente à tríade do Grupo-10 na classificação periódica dos elementos, além do níquel e do paládio. Estes metais possuem facilidade em formar complexos quadrado-planos, em detrimento aos demais metais de transição. Esta geometria é ideal para a modelagem molecular de drogas intercaladoras no DNA. Sua inserção entre os pares de bases nitrogenadas vizinhas do DNA ocorre através de forças de Van der Waals e em função da sua planaridade estrutural (FARRELL, 1989).

A cisplatina tem um alto poder de cura em tratamentos de câncer (mamário, ovário, testículos) porém possui alta toxicidade, o que limita sua dose (BRUIJNINCX, SADLER, 2008). Os principais efeitos colaterais são nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade (BUTOUR, WIMMER, CASTAN 1997, CORBI et al., 2007). Sua ação anti-*Leishmania* foi testada comprovando indução à morte celular e apoptose (TAVARES et al., 2007). Por sua vez, o mecanismo de inibição do

crescimento do parasito ocorre pela produção de radicais livres, bio-redução e interação com DNA (VIEITES et al., 2008).

Outros estudos da atividade antitumoral de complexos metálicos são relatados por vários pesquisadores como o ouro(III), isoeletrônico à platina que também apresenta atividade antitumoral, a atividade do rutênio (Ru) e ródio (Rh) citados por Dorcier e colaboradores (2008), o níquel (Ni) e cobalto (Co) citados por Liu e colaboradores (2007), o paládio (Pd) por Tušek-božc e colaboradores (2008) e o cobre (Cu) citado por Miernicka e colaboradores (2008).

A atividade dos metais sobre a *Leishmania* foi descrita por alguns autores como Navarro e colaboradores (2003) que testaram a atividade leishmanicida de complexos de cobre (Cu) sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* comprovando sua interação com o DNA do parasita. Além disso, também já foi relatada a atividade do ouro (Au) sobre culturas de promastigotas de *L. mexicana* interagindo sobre o DNA por intercalação (NAVARRO et al., 2008). Raychaudhury e colaboradores (2005) também demonstraram atividade de complexos com estanho sobre *Leishmania donovani*.

Os complexos contendo paládio(II) têm chamado a atenção como uma alternativa para novas drogas com base metálica, visto que sua coordenação geométrica e processo de formação de complexo são similares aos da platina (II) (TUŠEK-BOŽC et al., 2008), entretanto é menos tóxico ao organismo (QUIROGA; NAVARRO-RANNINGER, 2004). Dentre suas propriedades têm se destacado suas várias atividades biológicas como anti-câncer (CORBI et al., 2006), alterando a conformação da dupla-hélice do DNA (MATESANZ et al., 1999); atividade anti-protozoária contra a *Entamoeba histolytica* com IC₅₀ (concentração mínima inibitória de 50% dos parasitos) menor que Metronidazol®, droga de referência (HUSAIN, BHAT, AZAM, 2008); ação anti-inflamatória 10-15% melhor que a droga padrão Diclofenaco® (SHAHEEN et al., 2008), a atividade tripanocida causando stress oxidativo e danos ao DNA (OTERO, et al, 2006) e a atividade leishmanicida (MESA-VALLE et al., 1996). Essa característica do paládio pode ser utilizada como uma promissora droga no combate a leishmaniose.

Metha e Shaha (2006) ressaltam a preocupação quanto a resistência do parasito *Leishmania* spp. aos metalóides, pois já foi confirmado a existência de resistência cruzada de metalóides como o arsênio e o antimônio. Ambos induzem

morte celular pela fragmentação celular que é precedida por um aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta situação enfatiza a importância do estudo e o desenvolvimento de novos compostos no tratamento contra a leishmaniose.

Os complexos organometálicos contendo paládio em sua estrutura têm se revelado um promissor agente terapêutico apresentando uma atividade biológica diversificada, desde anti-inflamatória a antiprotozoária, além de possuir conhecida atividade anti-tumoral.

REFERÊNCIAS

ALIKOV, O.E. et al. Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. **Medical Laser Application**. v. 21, p. 251-260, 2006.

ALLARDYCE, C.S., et al. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. **J. Appl. Organomet.Chem.** v. 19, p. 1–10, 2005.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.22, n. 12, p. 552-557, 2006.

AIROLDI, C. Química inorgânica ou química da vida?. **Química Nova**, v. 17, n.2, p. 175-181, 1994.

ATHRI, P. et al. 3D QSAR on a library of heterocyclic diamidine derivatives with antiparasitic activity. **Bioorganic Medicinal Chemistry**., n.14, p. 3144–3152, 2006.

BALANÃ-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **Gen. Pharmac.** v. 30, n. 4, p. 435–443, 1998.

BATTES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**., v. 79, n. 2, p. 215-218,1994.

BENITE, A.M.C., MACHADO, S. P., BARREIRO E. J. Uma visão da Química Bioinorgânica Medicinal. **Química Nova**, v 30, n. 8, p. 2062-2067, 2007.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cad. Temáticos de Quím. Nova na Escola**, n. 6, P. 1-6, Julho, 2005.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Disease**, n. 24, p. 684–703, 1997.

BIVER, T.; SECCO, F., VENTURINI, M. Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, n. 252, p. 1163–1177, 2008.

BOSQUE, F. Et al. Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection of promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Journal of Parasitology**, n. 84, p. 1250–1256, 1998.

BRENDLE, J.J., Antileishmanial Activities of Several Classes of Aromatic Dications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n. 3, p. 797–807 Mar. 2002.

BRISTOW, C.A.; et al. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3, p. 162-167, 2006.

BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P.J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 197–206, 2008.

BUGGIANI, M.D.; TROIANO, M.; ROSSI, R.; LOTTI, T. Phtodynamic therapy: Off-label and alternative use in dermatological practice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 5, p. 134-138, 2008.

BUTOUR, J. L S.; WIMMER, P. C. Palladium(II) compounds acid derivatives with DNA in vitro **Chemico-Biological Interactions**, n. 104, p. 165-178, 1997.

CALONGE, M., et al. Effects of cationic diamidines on polyamine content and uptake on *Leishmania infantum* in *in vitro* cultures. **Biochemical Pharmacology**, n. 52, p. 835–841, 1996.

CAMARGO-NEVES, V.L.; et al. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Aracatuba, Sao Paulo, Brazil, 1998-1999. **Caderno Saúde Pública**, v.17, p.1263-1267. 2001.

CASTILLO-BLUM, S. E.; BARBA-BEHRENS, N.; Coordination chemistry of some biologically active ligands. **Journal of Coordination Chemistry Reviews**. n.196, p. 3-30, 2000.

CHEESMAN, S. J. The Topoisomerases of protozoan parasites. **Parasitology Today**, n.16, p. 277-281, 2007.

CORBI, P. P et al. Synthesis, spectroscopic characterization and biological analysis of a new palladium(II) complex with methionine sulfoxide. **Spectrochimica Acta Part A**, n.66, p. 1171–1174, 2007.

COSTA, C. et al Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biomedicine & Pharmacotherapy** , v. 63 p. 40-42, 2009.

CROFT, S. L. & COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p. 502-508, 2003.

CROFT S.L. & ENGEL E. Miltefosine — discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 100, p. 4-8, 2006.

CRUZ, I. et al. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**, n. 123, p. 357–88, 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, n. 72, p. 132–141, 2002.

CURY, A. J. **Pais brilhantes, professores fascinantes**. Rio de Janeiro: Sextante. 2003.

DAS, B.B. et al. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, pp. 221-232, Mar. 2006.

DAVIDSON, R.N. Leishmaniasis. **Protozoal Tropical Infections**, n. 33, v. 8, 2005.

DEROSA, M. C.; Crutchley, R., Photosensitized singlet oxygen and its applications **Journal of Coordination Chemistry Review**, n. 233-234, p. 351-371, 2002.

DESJEUX P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinical Dermatology**, n. 14, p.417–23, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new Perspectives. Comparative Immunology. **Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DORCIER, A. et al. Studies on the reactivity of organometallic Ru–, Rh– and Os–pta complexes with DNA model compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 5-6, p. 1066-1076, 2008.

FARIAS, R. F. **Para gostar de ler a história da química II**. Ed. Átomo, 2º ed., Campinas, SP, 2005.

FARREL, N. **Transition metals complexes as drugs and chemotherapeutic agents**. Oxford: Kluwer Academic Press, 1989. v.11. p.230-239.

FARREL, N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. **Journal of Coordination Chemistry Rev.** v. 232, p. 1-4, 2002.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda, Personal view, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, Aug. 2002.

GARDLO K, HORSKA Z, ENK CD, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. **Journal Am. Acad. Dermatol.** v. 48, p. 893–896, 2003.

GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S.K.; HADJILIADIS, N. Review-Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. **Journal of Coordination Chemistry Review**, v. 253, p. 1384–1397, 2009.

GASTALDO, J. et al. Induction and repair rate of DNA damage: A unified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals **Journal Theoretical Biology**, n. 251, p. 68–81, 2008.

GOMES-QUIROGA, A.; NAVARRO-RANNINGER, C.N. Review Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Journal of Coordination Chemistry Review**, n. 248, p. 119–133, 2004.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 4290-4297, 1990.

HARKER, P. R. Interação de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* com macrófagos da linhagem U-937. 1992. f 67. Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 1992.

HERWALDT BL. Leishmaniasis. **Lancet**, n. 354, p. 1191–99, 1999.

HUSAIN, K.; BHAT, A. R.; AZAM, A. New Pd(II) complexes of the synthesized 1-N-substituted thiosemicarbazones of 3-indole carboxaldehyde: Characterization and antiamebic assessment against *E. histolytica*. **European Journal Medicinal Chemistry**, v.20, p.1-13, 2008.

JEAN-MORENO, V.; et al. Leishmania donovani: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, n. 112, p. 21–30, 2006.

KENNER, J.R., et al. The United States Military and Leishmaniasis Advances in Military Dermatology. **Dermatologic Clinics** , v. 17, n. 1, p. 77-92, 1999.

KHAW, M.; PANOSIAN, C. B. Human antiprotozoal therapy: past, present and future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p. 427-439, 1995.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, v. 28, p. 44-48, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 94-105, 1992.

LERMAN, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. **Journal Molecular Biology**, London, v.3, n.1, p.18-30, 1961.

LIU, C. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes, **Journal of Coordination Chemistry Review**, n. 248, p. 147–168, 2004.

LIU, C.S. et al. Two New Co(II) and Ni(II) Complexes with 3-(2-Pyridyl)pyrazole-Based Ligand: Synthesis, Crystal Structures, and Bioactivities. **Chemical Pharm. Bulletin** v. 55, n. 7, p. 996-1001, 2007.

MAINGON, R.D.C. et al. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population substructure matter to *Leishmania* transmission? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 12-17, 2007.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MALAFAIA, G. O sinergismo entre a leishmaniose visceral e a desnutrição proteico-calórica. **Revista Saúde.Com**, Jequezinho, v. 4, n. 2, p. 134-147, jul./dez. 2008.

MARANHO, D.S. et al. Photoinduced Nitric Oxide and Singlet Oxygen release from ZnPC liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: synergistic effects in photodynamic therapy application. **Photochemistry and Photobiology**, n.85, p. 705-713, 2009.

MATESANZ, A.I. et al. Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II)-benzyl bis(thiosemicarbazone) **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 76, p. 29-37, 1999.

MBONGO, N. et al. Synergistic effects of Ir-(COT)-pentamidine alizarin red and pentamidine, amphotericin B and paromycin on *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, v. 70, p. 239-245, 1998.

MIERNICKA, M. ET al 2008. Cytotoxic effect, differentiation, inhibition of growth and theoretical calculations of an N,N-donor ligands and its platinum(II), palladium(II) and copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 102, p. 157-165, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral grave normas e condutas. Brasília, Ministério da Saúde; 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-GESTÃO 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.

MIRET, J. et al. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.26, p.1585-1594, 2008.

MITRA, A.M.R.C.P. ; STABLES, G.I. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3, p.116-127, 2006.

MESA-VALLE, C.M. et al. Antileishmanial Action of Organometallic Complexes of Pt(II) and Rh(I). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 5, p. 625-633, Sep./Oct., 1996.

MEHTA,A.; SHAHA, C. Mechanism of metalloinduced death in *Leishmania* spp.: Role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 40, p.1857–1868, 2006.

MS/FUNASA. **Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral**. In: Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional da Saúde, Brasília. Ed. 2, p. 27, Maio 2002.

MOAN,J.,PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Res.** v.23, p. 3591–3600, 2003.

MOLINA, R.; GRADONT, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 97, supplement n. 1, p. S29-S45, 2003.

MORENO,J. et al. HIV-*Leishmania* infantum co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. **Transactions of the royal society of Tropical Medicine and Hygiene** , v. 94, p. 328-332, 2000.

MORO, A.C. et al. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of [Pd(C², N-dmba)(Br)(tu)] (dmba=N,N-dimethylbenzylamine, tu = thiourea). **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4611-4615, 2009.

MORTY, R. Et al. A trypanosome oligopeptidase as a target for the trypanocidal agents pentamidine, diminazine and suramin. **FEBS Lett.**, n. 433, p.251–256, 1998.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet.**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NAVARRO, M. et al. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 8, p. 401–408, 2003.

NAVARRO et al. Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃.DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) Mexicana*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 101, p. 111–116, 2007.

NOWIS, D. et al. REVIEW The influence of photodynamic therapy on the immune response. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 283-298, 2005.

OLIVEIRA, C.D.; ASSUNCAO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Caderno Saúde Pública**, v.17, p.1231-1239, 2001.

OLIVIER M, BADARÓ R, MEDRANO FJ, MORENO J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 79-98, 2003.

OTERO, L. et al., Novel Antitrypanosomal Agents Based on Palladium Nitrofurylthiosemicarbazone Complexes: DNA and Redox Metabolism as Potential Therapeutic Targets, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49 n.11,p. 3322–3331, 2006.

PERRIN, L. et al. DNA targeted platinum complexes: synthesis, cytotoxicity and DNA interactions of *cis*-dichloroplatinum(II) complexes tethered to phenazine-1-carboxamides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 81, p. 111–117, 2000.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, jul./ago. 2003.

RAYCHAUDHURY, B. et al. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, n. 95, p. 1-8, 2005.

REMME, J. H. F. et al. Strategic emphases for tropical Diseases research: A TRD perspective. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 10, 2002.

RESENDE, S. M. Leishmaniose Visceral em Minas Gerais. **Boletim Epidemiológico**: Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2007.

RIBEIRO, R. R et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 2564-2572, 2008.

ROSENBERG, Barnett; VAN CAMP, Loratta; KRIGAS, Thomas. Inhibition of cell division in *Echerichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, London, v.205, n. 4972, p.698-699,1965.

SAMPAIO et al. Leishmaniose tegumentar associada a AIDS: relato de quatro casos clinicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n.35 v. 6, p. 651-654, nov-dez, 2002.

SANTOS, M. C. Planejamento racional de drogas contra tripanossomatídeos: gGAPDH de *Trypanosoma cruzi* e XPRT de *Leishmania major*. 2007. 181f, Tese de Doutorado em Física- Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers **Lancet Infect Disease**, n. 6, p. 342–49, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, II Fórum de Discussão sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina, Brasília/Df. 2009. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf >acessado 22. nov. 2009.

SERENO, D. et al. Antimonial mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SILVA, C. F. et al. Activity of “reversed” diamidines against *Trypanosoma cruzi* “in vitro”. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 1939-1946, 2007.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SINGH, G.; DEY, C. S. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. **Acta Tropica**, n. 103, p. 172–185, 2007.

SHAHEEN et al. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and anti-inflammatory activity of palladium(II) complexes with tertiary phosphines and heterocyclic thiolates: Crystal structure of [PdC₂₈H₁₉N₈PS₂]. **Journal of Organometallic Chemistry**, n. 693, p. 1117–1126, 2008.

SHAPIRO, T. A. Mitochondrial topoisomerase II activity is essential for kinetoplast DNA minicircle segregation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 3660-7, 1994.

SHRIVER, D.F.; Atkins, P.W. **Química Inorgânica**, Bookman Companhia. Editora, 4^a ed. 2008.

SHUKLA, A. K. et al. Rational Approaches for Drugs Designing Against Leishmaniasis. **Applied Biochemistry Biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-009-8764, 2009.

SOUZA, G. F. et al. Leishmanicidal activity of primary s-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxid**, v. 15, n. 3, p. 209-216. 2006.

SPANAKOSA, G. et al., Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 46-53, 2008.

TAVARES, J. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. **Acta Tropica**, n. 103, p. 133–141, 2007.

THOMAS, P. A. Emerging parasite zoonoses: the role of host±parasite relationship. **Journal of Parasitology**, n. 20, p. 1361-1367, 2000.

THOMPSON, K. H. e ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in Medicine. **Science**, v. 300, p. 936-939, 2003.

TRIPATHI, S., et al. Landrace/gender-based differences in phenol and thiocyanate contents and biological activity in *Piper betle* L. **Current Science**, v. 91, n. 6, p. 746–749, 2006.

TUŠEK-BOŽC, L. et al., 2008. Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium(II) complexes of monoethyl 8-quinolylmethylphosphonate. **Polyhedron**, n. 27, p. 1317–1328, 2008.

VIEITES, M. et al 2008. Platinum(II) metal complexes as potential anti-Trypanosoma cruzi agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 102, p. 1033–1043, 2008.

VIEITES, M. et al. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5 nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 411-418, 2009.

VISBAL, G. et al. Synthesis and characterization of platinum–sterol hydrazone complexes with biological activity against Leishmania (L.) Mexicana. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 3, p. 547-554, 2008.

VILLINSKI, J. T. et al. Evidence for a new species of Leishmania associated with a focal disease outbreak in Ghana. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. n. 60, p. 323–327, 2008.

YOSHIKAWA, Y. et al. Alpha-glucosidase inhibitory effect of anti-diabetic metal ions and their complexos. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1339-1341, 2009.

WALTON, B. C. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Cap. **American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis**, In: London Academic Press, p. 637-664, 1987.

WHO, TDR-Tropical Disease Research. Progress 2003–2004. **Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases**. Geneva, 2005. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>.> acessado em 15 de outubro de 2009.

WHO,2009.<http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html> Acessado em 22 Nov 2009.

2. ARTIGO

O artigo mostra os resultados da síntese, caracterização e atividade leishmanicida de doze novos complexos de paládio(II) e de seus respectivos ligantes sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos murinos.

O artigo foi submetido à Journal of Inorganic Biochemistry, Qualis A internacional e fator de impacto 3.133.

Confirmation of Submission

Segunda-feira, 1 de Fevereiro de 2010 21:46

De: "Editor, Journal of Inorganic Biochemistry" <JIB@sc.edu>

Para: lillypf@yahoo.com.br

Miss Lilian,

Your submitted manuscript, entitled "Evaluation of the leishmanicidal activity on *Leishmania (L.) amazonensis* of organopalladated compounds containing nitrogenated ligands with halide/pseudohalides as substituents.", has been received by the online submission system of the Journal of Inorganic Biochemistry.

You may check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

<http://ees.elsevier.com/jinorgbio/>

Your username is: Lilian Franco

Thank you for submitting your paper to the Journal of Inorganic Biochemistry.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Inorganic Biochemistry



Evaluation of the leishmanicidal activity on *Leishmania*
(*L.*) *amazonensis* of organopalladated compounds
containing nitrogenated ligands with halide/
pseudohalides as substituents.

Lilian Pereira Franco ^a, Elba Pereira de Góis ^b, Bárbara Santoni Codonho ^a, Ana
Laura Raymundo Pavan ^a, Ivan de Oliveira Pereira ^a, Eduardo Tonon de Almeida ^b,
Marcos José Marques ^{a,*}

^a *Departamento de Ciências Biomédicas Universidade Federal de Alfenas, Rua
Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas – MG, Brazil*

^b *Departamento de Ciências Exatas Universidade Federal de Alfenas, Rua
Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas – MG, Brazil*

*Corresponding author:

Tel.: +553532991475 / Fax: +553532991067

E-mail address: marques@unifal-mg.edu.br

Abstract

Leishmaniasis, considered a neglected disease, is caused by a protozoan from the genus *Leishmania*. The chemotherapy options are limited and have common problems: long duration of therapy, high cost, parasite resistance, variable efficacy between strains or species, several drug side effects and toxicity. The HIV/Leishmania co-infection has changed the geographical distribution and the incidence of the disease. Due to necessity of new therapeutic agents, twelve new palladium(II) complexes, obtained from two imine ligands, were synthesized and characterized by elemental analyses, Infrared and ^1H NMR spectroscopies. The *in vitro* evaluation of ligands and complexes has been tested on promastigote and amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and its cytotoxicity on murine macrophages. Most complexes exhibited a leishmanicidal activity which ranged from 5.72-53.01 $\mu\text{g/mL}$ to the IC_{50} . The ligands activities were improved after coordination with palladium and the replacement by some substituents has increased even more the leishmanicidal activity. Complexes with chloride and thiocyanate were the most active, with better selectivity index ($\text{SI} > 1$) and less damage on mammalian cells when compared to a reference drug pentamedine. These compounds are promising agents for leishmaniasis treatment and the results emphasize the potential properties of compounds with transition metal for medical applications.

Keywords: Palladium(II) complexes, Leishmaniasis, treatment.

1. Introduction

Leishmaniasis is a group of tropical diseases caused by kinetoplastid parasites of about 20 species of the genus *Leishmania* sp. which is transmitted to the vertebrate host by the bite of the phlebotomine sandfly. The protozoan parasite *Leishmania* has the ability of adapting in vertebrate and invertebrate hosts with different forms between flagellated extracellular promastigote and nonflagellated intracellular amastigote [1]. There are two main clinical manifestations, cutaneous and visceral (kala-azar) leishmaniasis. According to the World Health Organization, WHO, leishmaniasis is an emerging and uncontrolled Category I disease and constitutes a major public health problem. It can be found in more than 80 countries hosting 350 million people and the number of new cases of cutaneous and visceral leishmaniasis is estimated at 1.5 million and 500,000 annually, respectively [2-4]. People of all ages are at risk of infection with leishmaniasis if they live or travel to endemic regions. Currently, its geographical distribution has changed and the risk has increased due to the incidence of HIV/*Leishmania* co-infection [5], changing their expression and allowing the dissemination of parasites [6, 7].

There are no effective vaccines available, the drugs used to treat the disease are limited and remain less than satisfactory. The first-line chemotherapy is based on pentavalent organoantimonials (Pentostam®, Glucantime®, both drugs have been used for over 60 years). Amphotericin B, pentamidine and miltefosine are used in cases of antimonial resistance [8], although some regions have reported resistance [9]. However, these agents have common problems: long duration of therapy, high cost, parasite resistance, variable efficacy among strains or species, several drug side effects and toxicity [10].

In fact, between 1975-1999 only 16 new drugs were introduced for the treatment of neglected diseases [11]. Thus, there is an urgent need to search for safer, cheaper and more effective treatments against leishmaniasis. In this context, transition metal complexes activities have been studied since 1965, when Rosenberg discovered the antitumor properties of cisplatin [12,13]. Palladium(II) complexes have become an interesting alternative as metal-based drugs, besides its antitumor activity they have significant applications in biological systems as antiviral, anti-inflammatory [14], antimalarial, antifungal, antimicrobial [15] and antiprotozoal activities [16].

In this work, the synthesis and characterization of two series of new cyclopalladated complexes from two imine ligands are reported. The complexes of formulas $[\text{Pd}_4(\text{LA})_n(\text{X})_4]$ were obtained from the ligand *N,N'*-bis[(1*E*)-(4-methoxyphenyl)methylene]benzene-1,4-diamine (HLA) (**1**) (series A, **2-7**) where $n = 2$ or 3 , $\text{X} = \text{Cl}$ (**2**), N_3 (**3**), NCO (**4**), SCN (**5**), Br (**6**), I (**7**) and the complexes of formulas $[\text{Pd}_4(\text{LB})_n(\text{X})_4]$ were obtained from the ligand *N,N'*-bis[(1*E*)-(4-methoxyphenyl)methylene]benzene-1,2-diamine (H_2LB) (**8**) (series B, **9-14**) where $n = 2$ or 3 , $\text{X} = \text{Cl}$ (**9**), N_3 (**10**), NCO (**11**), SCN (**12**), Br (**13**) e I (**14**). Compounds were studied by elemental analyses, Infrared (IR) and ^1H NMR spectroscopies and *in vitro* evaluations on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes, intracellular amastigotes growth and cytotoxicity on murine macrophages.

2. Methods

2.1. Materials

All the compounds were synthesized at room temperature and the reagents were purchased from commercial sources and used without further purification.

2.1.1. Physical Measurements

Elemental analyses of carbon, nitrogen and hydrogen were performed on a Perkin-Elmer CHN 2400 microanalyzer. The elemental analyses of Pd were obtained by Thermogravimetric Analysis (TG) on a thermobalance TA-Instruments Q600. Melting points (m.p.) were determined on a Marconi (PFMII) apparatus. IR spectra were recorded in solid state using KBr pellets on a Shimadzu– IR – Prestige 21 spectrometer in the $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ range. ^1H NMR spectra were obtained from CDCl_3 solutions on a Bruker AC-200 spectrometer working at 200 MHz for ^1H .

2.1.2. Syntheses of series A: compounds **1-7**

The ligand, compound **1**, was synthesized as follows: a suspension of anisaldehyde 1.170 g (8.60 mmol) in ethanol (2 mL) was added dropwise to an

ethanolic solution (20 mL) of *p*-phenylenediamine 0.470 g (4.30 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. A green solid was formed after cooling for 24 h. The precipitate was filtered off and washed with ethanol, water and ethylic ether and dried under vacuum.

The complex $[\text{Pd}_4\text{LA}_3\text{Cl}_4]$, compound **2**, was synthesized as follows: a solution of the corresponding ligand **1** 0.400 g (1.16 mmol) in methanol (20 mL) was slowly added dropwise to the solution containing palladium(II) chloride 0.411 g (2.32 mmol) and lithium chloride 0.197 g (4.46 mmol) dissolved in methanol (50 mL). The resulting solution was stirred at room temperature for 6 h. An orange precipitate was formed which was filtered off and was washed with ethanol, water and ethylic ether and dried under vacuum. The complexes **3-7** were synthesized as follows: a solution of compound **2** 0.300 g (0.19 mmol) in acetone (50 mL) was mixed with a 5 mL water solution of the corresponding salts NaN_3 0.049 g (0.76 mmol), KCNO 0.049 g (0.76 mmol), KSCN 0.062 g (0.76 mmol), KBr 0.09 g (0.76 mmol) and KI 0.126 g (0.76 mmol) at room temperature. In all cases the mixture was stirred for 2 h and the solids formed were filtered off, washed with acetone, water and ethylic ether and dried under vacuum. The structure of the compounds **2-5** (Fig. 1) and **6-7** (Fig. 2) are shown below.

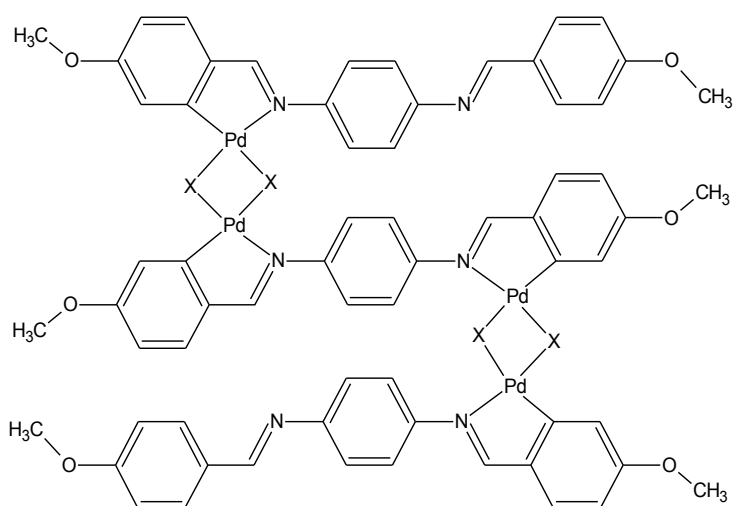


Figure 1. Proposed structure of compounds **2-5** $[\text{Pd}_4\text{LA}_3\text{X}_4]$ X = Cl (**2**), N_3 (**3**), CNO (**4**), SCN (**5**).

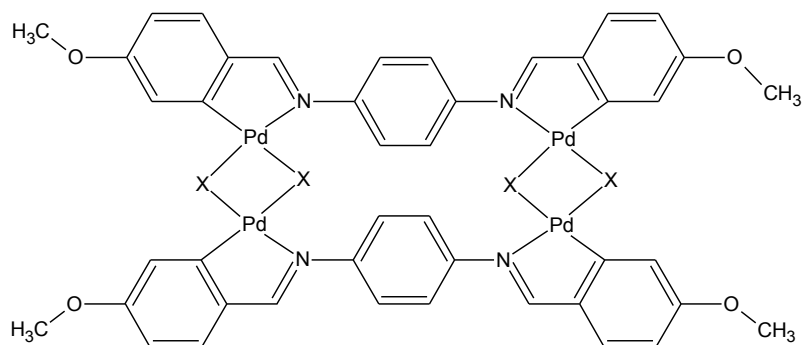


Figure 2. Proposed structure of compounds $[Pd_4LA_2X_4]$ X = Br (**6**) e I (**7**).

Ligand 1, HLA. Yield: 87%, $\lambda_{max(1)}$ (MeCN) = 354, $\lambda_{max(2)}$ (MeCN) = 282; m.p.: 205°C, IR (cm^{-1}): $\nu(CH)_{ar}$ 3066, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2958, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2841, $\nu(C=N)$ 1614, $\nu(C-N)$ 1508, $\nu(C-O)$ 1022, $\delta(C-H)_{aromatic}$ 848. Anal. $C_{22}H_{20}O_2N_2$ (344.40 g mol⁻¹) C, H, N.

Complex 2, $[Pd_4LA_3Cl_4]$. Yield: 93%, $\lambda_{max(1)}$ (MeCN) = 336, $\lambda_{max(2)}$ (MeCN) = 271; m.p.: 260°C(dec.), IR (cm^{-1}): $\nu(CH)_{aromatic}$ 3116, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2933, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2841, $\nu(C=N)$ 1593, $\nu(C-N)$ 1510, $\nu(C-O)$ 1018, $\delta(C-H)_{ar-1}$ 835. Anal. $C_{66}H_{56}O_6N_6Cl_4Pd_4$ (1,594.68 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 3, $[Pd_4LA_3(N_3)_4]$. Yield: 81%, $\lambda_{max(1)}$ (MeCN) = 327, $\lambda_{max(2)}$ (MeCN) = 271; m.p.: 145°C (dec.), IR (cm^{-1}): $\nu(CH)_{aromatic}$ 3123, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2922, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2855, $\nu(C=N)$ 1600, $\nu(C-N)$ 1510, $\nu(C-O)$ 1024, $\delta(C-H)_{aromatic}$ 835. Anal. $C_{66}H_{56}O_6N_{18}Pd_4$ (1,622.94 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 4, $[Pd_4LA_3NCO_4]$. Yield: 82%, $\lambda_{max(1)}$ (MeCN) = 351, $\lambda_{max(2)}$ (MeCN) = 274; m.p.: 180°C (dec), IR (cm^{-1}): $\nu(CH)_{aromatic}$ 3117, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2929, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2839, $\nu(C=N)$ 1600, $\nu(C-N)$ 1510, $\nu(C-O)$ 1026, $\delta(C-H)_{aromatic}$ 835. Anal. $C_{66}H_{56}O_6N_6Cl_4Pd_4$ (1,622.93 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 5, $[Pd_4LA_3SCN_4]$. Yield: 85%, $\lambda_{max(1)}$ (MeCN) = 310, $\lambda_{max(2)}$ (MeCN) = 252; m.p.: 146°C (dec.), IR (cm^{-1}): $\nu(CH)_{aromatic}$ 3002, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2931, $\nu(C-H)_{aliphatic}$ 2833, $\nu(C=N)$ 1602, $\nu(C-N)$ 1510, $\nu(C-O)$ 1028, $\delta(C-H)_{aromatic}$ 827. Anal. $C_{70}H_{56}O_6N_{10}S_4Pd_4$ (1,687.19 g mol⁻¹) C, H, N, S, Pd (TG).

Complex 6, $[Pd_4LA_2Br_4]$. Yield: 90%, $\lambda_{max(1)}$ (MeCN) = 331, $\lambda_{max(2)}$ (MeCN) = 267;

m.p.: 230°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3116, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2927, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2852, $\nu(\text{C=N})$ 1593, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1018, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 833. Anal. C₄₄H₃₆O₄N₄Br₄Pd₄ (1,430.07 g mol⁻¹): C, H, N, Pd (TG).

Complex 7, [Pd₄LA₂I₄]. Yield: 88%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN)= 344, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 268; m.p.: 165°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3115, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2924, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2831, $\nu(\text{C=N})$ 1575, $\nu(\text{C-N})$ 1494, $\nu(\text{C-O})$ 1022, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 831. Anal. C₄₄H₃₆O₄N₄I₄Pd₄ (1,618.07 g mol⁻¹): C, H, N, Pd (TG).

2.1.3 Synthesis of series B: compounds **8-14**

The synthesis of the ligand **8** was performed by a modification of a previously reported procedure [17]. Anisaldehyde 1.170 g (8.6 mmol) in ethanol (2 mL) was added dropwise to an ethanolic solution (20 mL) of *o*-phenylenediamine 0.460 g (4.30 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. A yellow solid was formed after cooling for 24 h. The precipitate was filtered off and washed with ethanol, water and ethylic ether and dried under vacuum.

The complex [Pd₄LB₃Cl₄], compound **9**, was synthesized as follows: a solution of the corresponding ligand **8** 0.500 g (1.45 mmol) in methanol (20 mL) was slowly added dropwise to the solution containing palladium(II) chloride 0.515 g (2.90 mmol) and lithium chloride 0.246 g (5.80 mmol) dissolved in methanol (50 mL). The resulting solution was stirred at room temperature for 6 h. Brown precipitate was formed which was filtered off and was washed with ethanol, water and ethylic ether and dried under vacuum. The complexes **10-14** were synthesized as follows: a solution of compound **9**, 0.300 g (0.19 mmol) in acetone (50 mL), was mixed with a 5 mL water solution of the corresponding salts NaN₃ 0.049 g (0.76 mmol), KCNO 0.049 g (0.76 mmol), KSCN 0.062 g (0.76 mmol), KBr 0.090 g (0.76 mmol) and KI 0.126 g (0.76 mmol) at room temperature. In all cases, the mixture was stirred for 2 h and the solids formed were filtered off, washed with acetone, water and ethylic ether and dried under vacuum. The structure of the compounds **9** (Fig. 3) and **10-14** (Fig. 4) are shown below.

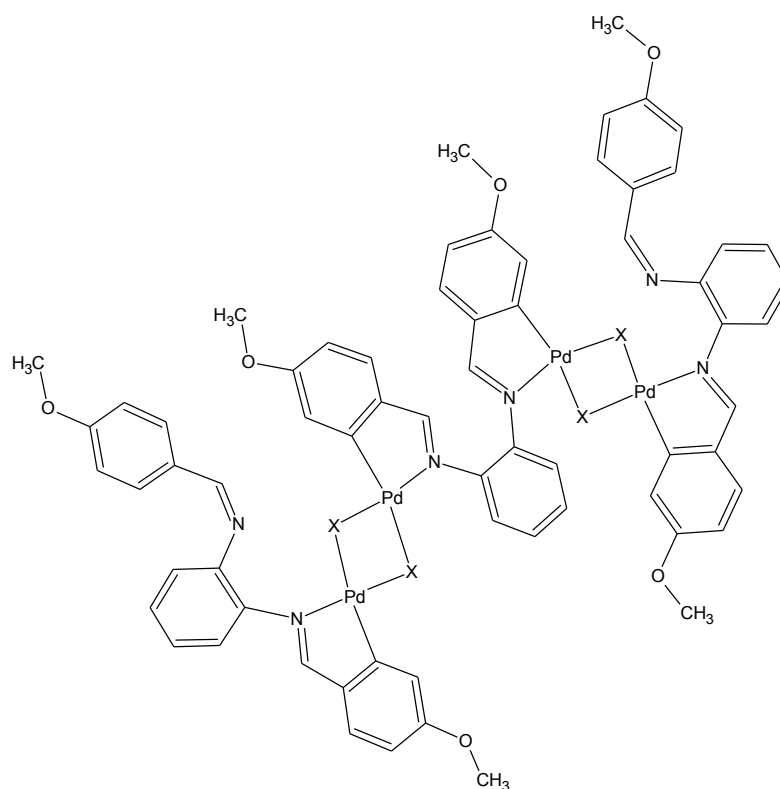


Figure 3. Proposed structure of compounds **9** [Pd₄LB₃Cl₄].

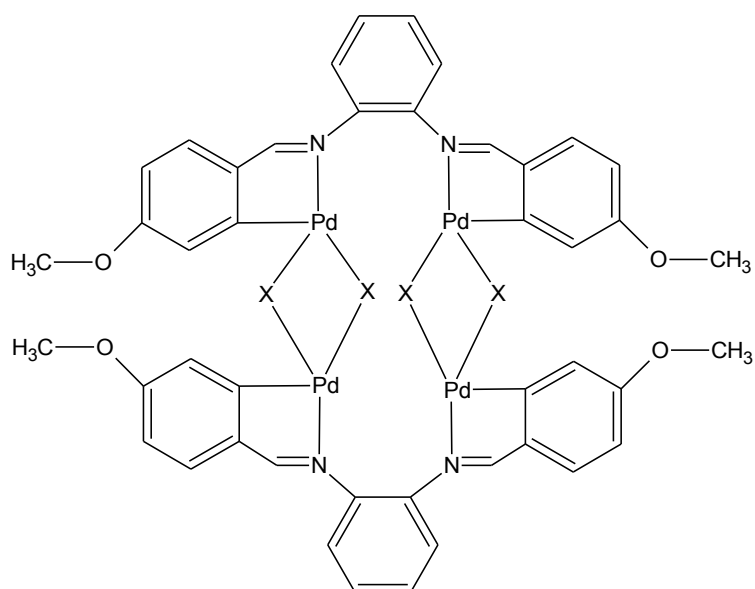


Figure 4. Proposed structure of compounds [Pd₄LB₂X₄] X = N₃ (**10**), CNO (**11**), SCN (**12**), Br (**13**) and I (**14**).

Ligante 8, H₂LB. Yield: 89%, $\lambda_{\max(1)}$ (MeCN) = 370, $\lambda_{\max(2)}$ (MeCN) = 283; m.p.:

90°C, IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3007, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2926, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2835, $\nu(\text{C=N})$ 1600, $\nu(\text{C-N})$ 1508, $\nu(\text{C-O})$ 1026, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 746. Anal. C₂₂H₂₀O₂ N₂ (344.40 g mol⁻¹): C, H, N, Pd (TG).

Complexo 9, [Pd₄LB₃Cl₄]. Yield: 83%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN) = 277, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 253; m.p.: 260°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3068, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2933, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2832, $\nu(\text{C=N})$ 1598, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1020, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 758. Anal. C₆₆H₅₆O₆N₆Cl₄Pd₄ (1,596.68 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complexo 10, [Pd₄LB₂(N₃)₄]. Yield: 48%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN) = 328, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 255; m.p.: 190°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3057, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2933, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2837, $\nu(\text{C=N})$ 1598, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1020, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 754. Anal. C₄₄H₃₆O₄N₁₆Pd₄ (1,278.54 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 11, [Pd₄LB₂NCO₄]. Yield: 51%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN) = 318, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 282; m.p.: 182°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3061, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2933, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2839, $\nu(\text{C=N})$ 1598, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1008, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 756. Anal. C₄₈H₃₆O₈N₈Pd₄ (1,278.53 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 12, [Pd₄LB₂SCN₄]. Yield: 68%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN) = 279, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 249; m.p.: 148°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3059, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2931, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2835, $\nu(\text{C=N})$ 1598, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1024, $\delta(\text{C-H})_{\text{ar-1}}$ 758. Anal. C₄₈H₃₆O₄N₈S₄Pd₄ (1,342.79 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 13, [Pd₄LB₂Br₄]. Yield: 65%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN) = 271, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 248; m.p.: 208°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3069, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2962, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2839, $\nu(\text{C=N})$ 1598, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1020, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 758. Anal. C₄₄H₃₆O₄N₄Br₄Pd₄ (1,430.08 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

Complex 14, [Pd₄LB₂I₄]. Yield: 70%, $\lambda_{\text{max}(1)}$ (MeCN) = 267, $\lambda_{\text{max}(2)}$ (MeCN) = 264; m.p.: 107°C (dec.), IR (cm⁻¹): $\nu(\text{CH})_{\text{aromatic}}$ 3005, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2966, $\nu(\text{C-H})_{\text{aliphatic}}$ 2833, $\nu(\text{C=N})$ 1597, $\nu(\text{C-N})$ 1510, $\nu(\text{C-O})$ 1024, $\delta(\text{C-H})_{\text{aromatic}}$ 758. Anal. C₄₄H₃₆O₄N₄I₄Pd₄ (1,618.08 g mol⁻¹) C, H, N, Pd (TG).

2.2. *In vitro* Antileishmanial activity

2.2.1. Parasites

Promastigotes of *L. (L) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ by weekly subpassages in Schneider's Drosophila medium (Sigma, USA) at 25°C supplemented with 10.0% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1.0% penicillin (10000 UI/mL)/streptomycin (10.0 mg/mL) (Sigma, USA) in 50 mL culture flasks [18].

2.2.2 Promastigotes assay

Parasites were harvested in log-phase of growth and were counted in Neubauer's chamber, resuspended in fresh culture medium and adjusted to a concentration of 1×10^6 parasites/mL. The culture was incubated on a 24-well plate in Schneider's medium for 72 hr in the presence of different concentrations of compounds. Drugs were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) which final concentration never exceeded 0.6% v/v, and added to the culture media to give 0.1–70 $\mu\text{g/mL}$ final concentrations. After 72 h of incubation, the surviving parasites were counted in a Neubauer's chamber and compared with controls, with only DMSO and no drugs in concentration of 0.6% v/v, and the inhibitory growth concentration (IC_{50}) was expressed as the concentration at which compound induces 50.0% of reduction in parasite proliferation. All tests were performed in triplicate on three different occasions. Pentamidine isethionate (Sigma, USA) and Amphotericin B were used as the reference drugs [19].

2.2.3 Intracellular amastigotes assay

Macrophages were collected from the peritoneal cavity of female Swiss mice by washing with PBS (phosphate buffered saline) and seeded at 8×10^5 per well on a glass slides of 13 mm (Nunc, USA) and left at room temperature for 30 minutes for attachment. The cell viability was determined with trypan blue test and counted in Neubauer's chamber. Then, the non-adherent cells were removed by one-step

washing with PBS and the incubation was performed in a RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10.0% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1.0% penicillin (10000 UI/mL)/streptomycin (10.0 mg/mL) for 24 h at 37°C in a humidified chamber containing 5% CO₂ to become adherent. The macrophage culture was infected with stationary phase promastigotes (5 parasites/host cell) during 24 h at 37°C with 5% CO₂. Non-internalized parasites were removed by washing with PBS and the infected cells were incubated with different concentrations of the compounds (in the range of 0.1–70 µg/mL) dissolved in DMSO at the final concentration of 0.6% v/v for 72 h at 37°C and 5% CO₂. After 72 h of incubation, the cells were washed with PBS; the slides were fixed with methanol, stained with 10.0% Giemsa and examined under an oil immersion objective of the light microscope. At least 200 macrophages were counted per well for calculating the percentage of infected cells. The *in vitro* sensitivity percent inhibition was calculated in relation to the control, only with DMSO, for the determination of IC₅₀ value [20]. All tests were performed in triplicate on two different occasions and Pentamidine isethionate (Sigma, USA) was used as the reference drug.

2.2.4. Cytotoxicity evaluation

The cytotoxic effect of the compounds expressed as cell viability was assayed on mice's peritoneal macrophages by using a colorimetric method as described by Mossman [21] with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT). A suspension of 8×10^5 cells/well was incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10.0% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1.0% penicillin (10000 UI/mL)/streptomycin (10.0 mg/mL) were added to each well in 24-well plates for 24 h at 37°C in a humidified chamber containing 5% CO₂. After 24 h, the non adherent cells were removed by washing with PBS. Thus, several concentrations of the compounds (in the range of 0.1 to 70.0 µg/mL) were added to the wells containing the cells. These substances were solubilized in DMSO at the final concentration of 0.6% v/v and the plates were incubated for 72 h more. Then, the non adherent cells were removed by washing with PBS and 50.0 µl of MTT was added to each well at concentration of 5.0 mg/mL, and incubated for four hours more. After this, the medium was removed and 600.0 µl of DMSO was added to each well

and it was homogenized for 15 min. The cytotoxicity of the compounds was determined by the amount of formazan, a product generated by the indicator of cell viability which is directly proportional to the number of living cells by measuring the optical density (OD) of each well, at 570nm, in comparison to the control (0.6% DMSO and in the absence of any drug). The percentage of inhibition was calculated as followed: $\text{percentage} = [(OD_{\text{control}} - OD_{\text{drugs}}) / (OD_{\text{control}} \times 100)]$ [19].

Experiments were carried out in triplicate on two different occasions and Pentamidine isethionate (Sigma, USA) was used as the reference drug. To evaluate the selectivity of the compounds, the *in vitro* selective index (SI) was calculated according to the following formula and corresponds to the ratio between cytotoxic and antiparasitic activity on amastigote form: $SI = (CC_{50} / IC_{50})$ [22].

2.2.5 Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate, and repeated three times. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and the Cytotoxic Concentration of 50% (CC_{50}) were determined by non linear regression model ($r^2 > 0.9$) followed by variance analysis (ANOVA). Differences were considered at the 0.05 level of significance.

3. Results and Discussion

The synthesis and characterization of transition metal complexes have been studied as a new option for leishmaniasis treatment due to the limitation of the conventional therapy [23]. Throughout Rosenberg's search about biological activity of cisplatin in 1965, the interaction of platinum (Pt) complexes on inhibition of cell division and replication processes was proposed by its action as intercalative DNA binding [24,25]. Since that, several biological assays with transition metals (ruthenium, cobalt, platinum, palladium, rhenium and gold) have been reported in the literature [26-32]. Recently Pt complexes have been tested and demonstrated antitrypanosomal and antileishmanial activities besides its antitumor action [33,34]. Palladium (II) is from the same group as platinum, both are soft Lewis acids and have geometric similarities forming square-planar coordination geometry. This coordination can enhance the metal's ability for intercalative binding and Pd complexes showed

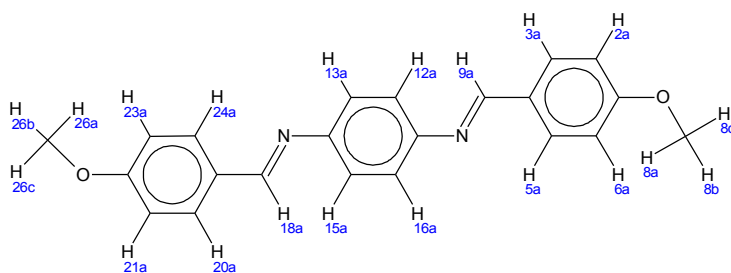
less toxicity than Pt [15]. Besides the anti-tumor and anti-microbial activities, other properties of palladium (Pd) complexes have been evaluated as antifungal, antiprotozoal and anti-inflammatory activities [14, 15, 28]. Thus, Pd complexes have been showed as innovated metal-based candidates.

3.1. Spectroscopic characterization

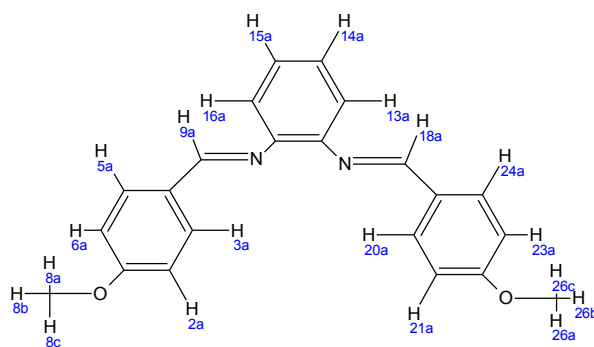
Elemental analyses for the synthesized ligands and cyclopalladated complexes were in agreement with the proposed formulae and the data from compound **8** have been reported and discussed previously [17]. The $\delta(\text{C-H})_{\text{ar-1}}$ bands recorded in the IR spectra for series A appears at approximately 827-848 cm^{-1} while series B were observed at approximately 746-758 cm^{-1} . The coordination of the ligands with palladium was evidenced by shift of $\nu(\text{C=N})$ band of the ligands **1** and **8** at 1614 and 1600 cm^{-1} , respectively, to lower frequencies at approximately 1575-1602 cm^{-1} for series A and 1597-1598 cm^{-1} for series B [35].

^1H NMR spectra performed (Table 1), confirm the structures of the synthesized complexes, and the results are in agreement with those of the IR spectroscopy. After the coordination, the effect of the metal is apparent for the protons that are located close to the coordinating atoms. These modifications indicate the difference between the ligands *para* and *ortho* isomers.

Table 1 - ^1H NMR Chemical Shift Values (δ , ppm) of the ligands (**1** and **8**) and the Pd complexes $[\text{Pd}_4(\text{LA})_n(\text{X})_4]$ and $[\text{Pd}_4(\text{LB})_n(\text{X})_4]$ at 200 MHz.



(1)



(8)

Compound	¹ H NMR						
	δ (ppm)						
	8 _{a-c} , 26 _{a-c}	2 _a , 6 _a , 21 _a , 23 _a	12 _a , 13 _a , 15 _a , 16 _a	13 _a , 16 _a	14 _a , 15 _a	3 _a , 5 _a , 20 _a , 24 _a	9 _a , 18 _a
1	3.79 – 3.82	6.90 – 6.95	7.18	-	-	7.76 – 7.81	8.37
2	3.83	6.93-6.96	7.19	-	-	7.76-7.79	-
3	3.82-3.83	6.93-6.97	7.19	-	-	7.76-7.79	-
4	3.88-3.90	6.98-7.01	7.26	-	-	7.83-7.88	-
5	3.79-3.82	6.83-6.95	7.19	-	-	7.76-7.79	-
6	3.90	6.99-7.92	7.26	-	-	7.83-7.84	-
7	3.87-3.90	7.00	7.26	-	-	7.83	-
8	3.81-3.89	6.74-7.03	-	7.29	7.64	7.88-7.90	8.49
9	3.92	7.02-7.05	-	7.28	7.51	7.85-7.88	-
10	3.90	7.00-7.02	-	7.26	7.55	7.83	-
11	3.35	7.04-7.15	-	-	7.51	7.86-7.94	-
12	3.89	6.99-7.02	-	7.26	7.49	7.83-7.86	-
13	4.69	5.96	-	6.82	7.49	7.29	-
14	3.89	6.99-7.02	-	7.26	7.51	7.83-7.86	-

3.2. *In vitro* Antileishmanial activity

As a search for new therapeutic agents, we have evaluated the growth inhibition action of fourteen compounds synthesized (**1-14**) against promastigote, intracellular

amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, and their cytotoxicity on intraperitoneal macrophages.

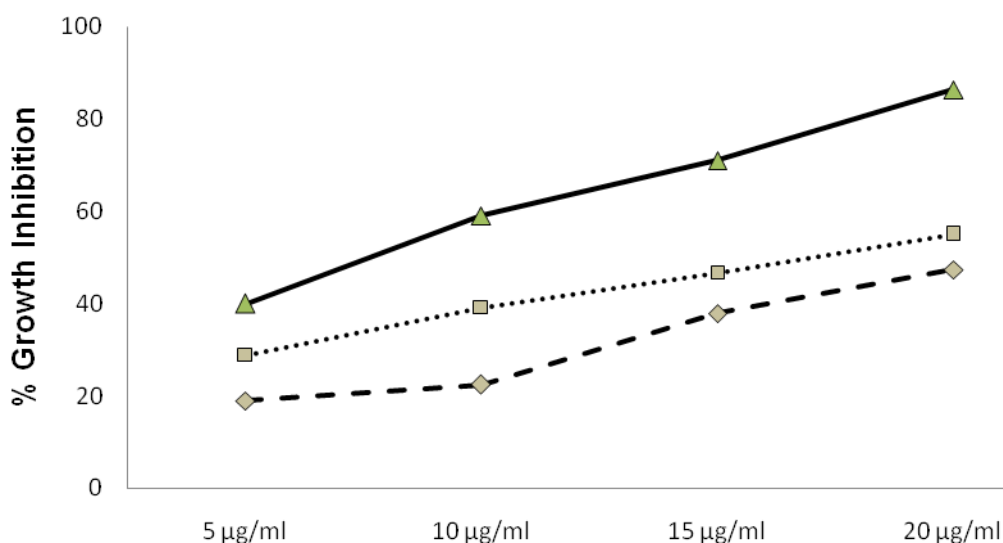


Figure 5. Percentage of growth inhibition on promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* by ligand **1** (dash line), complex **2** (dot line) and complex **5** (solid line). Promastigotes were cultured for 72 h in the presence of different concentrations of compounds (5, 10, 15 and 20 µg/mL).

A screening test was performed to evaluate the effect of the compounds on promastigote forms and the concentrations used on Fig. 5 were considered significant with $p < 0.05$ when compared with control. The result showed a dose-dependent inhibition of growth after the incubation time. Complex **2** showed a considerable increase in percentage of inhibition growth when compared with the free ligand **1** and complex **5** improved the inhibition even more than complex **2**. The improvement of leishmanicidal activity of Pd complexes is observed after the coordination with the metal and a better response was followed by the replacement of chloride by the thiocyanate. Moro and col. [36] reported a better activity after the replacement for a different substituent.

For comparison, the IC_{50} values of the compounds are shown in Table 2 and ranged from 2.23 to over 70.00 µg/mL. The IC_{50} values were used to determine comparatively the leishmanicidal activity from the series A and B compounds. The inhibitory effect of the compounds against the promastigote forms shows some different responses between series A from B.

Table 2 - IC₅₀ values of the inhibition growth of the ligands and their palladium (II) complexes against promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis*.

Compound	Promastigotes IC ₅₀ (µg/mL)*
1	20.83
2	15.04
3	25.58
4	>70.00
5	9.84
6	35.64
7	16.89
8	2.23
9	5.91
10	5.72
11	8.27
12	6.31
13	6.37
14	8.26
Pentamidine	0.44
Amphotericin B	6.95

* Test vs control ($p < 0.05$).

The values of series A were over 10 µg/mL while the IC₅₀ values of series B were under this concentration and the activity were similar among them. The leishmanicidal activities follow a trend that can be observed as series B > series A. Between the free ligands, the compound **8** was more effective than **1**. Complex **5** presented the lowest value of series A and its IC₅₀ is about half the value of ligand **1**. In comparison to the complexes with the same substituent from series A and B, complex **11** was almost 8.5-fold more active than the complex **4**. The replacement of azide by the bromide decreased the inhibition activity of the complex from series A while in series B the effect was the opposite. The cyanate complex from series A had an unsatisfactory action.

In addition, the reference drug pentamidine presented the lowest value, however the compounds from series B possess an approximate IC₅₀ value when compared with amphotericin B, another leishmanicidal drug. The IC₅₀ of compound **4** was not exactly determined due to the high value.

After the test on promastigote forms, nine compounds were chosen randomly to be evaluated against intracellular amastigotes (Table 3).

Table 3 - Leishmanicidal activity of the ligands and palladium (II) complexes on intracellular amastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis* and their cytotoxicity effects on peritoneal macrophages murine.

Compound	Amastigotes ^a	Cytotoxicity ^b	SI ^c
	IC ₅₀ (µg/mL)*	CC ₅₀ (µg/mL)*	
1	41.70	21.56	0.61
2	28.28	20.10	0.71
5	14.84	25.36	1.71
7	39.14	nd	nd
8	25.97	20.2	0.78
9	21.74	35.20	1.62
11	53.01	nd	nd
12	20.84	33.40	1.60
13	28.82	nd	nd
Pentamidine	6.62	3.82	0.58

nd = not determined.

^a Concentration for decrease of 50% infected macrophages in treated vs nontreated wells.

^b Cytotoxic concentration for 50% murine macrophages.

^c SI = ratio between CC₅₀ and IC₅₀.

* Test vs control ($p < 0.05$).

Leishmania parasites have two cycle stages, one in the invertebrate vector and another in the vertebrate host. The promastigote forms, after invading the mammalian cells, are transformed to the nonflagellated amastigote, which multiply in the macrophages in their vertebrate hosts. The *in vitro* assay on intracellular amastigotes in intraperitoneal mouse model is able to simulate a correlation with the *in vivo* response [37, 38].

The biological evaluation on amastigote forms, exhibited the need of a higher concentration to inhibit 50% of growth. The values ranged from 14.84 to 53.01 µg/mL to the IC₅₀ showing two fold more the concentration value from promastigote test. This may have occurred due to the difficulty to reach the parasite within macrophages [19]. Ligand **8** was more effective than the ligand **1** and after the coordination with the metal-center, the complexes had their activities increased where series B proved to be better than A. The most active replacement was with thiocyanate, either in series A as in B. The following trend is observed in the

increasing of activity from both series: free ligand < complexes Cl < complexes SCN.

The activity of thiocyanate has been proved in different biological assays as anticancer, antibacterial and antifungal at relatively low concentrations because of its property to bind to proteins and act as a non-competitive inhibitor [20, 39, 40]. These results indicate that thiocyanate increase biological effects while the action of cyanate complex **11** was disappointed on amastigotes assay.

To identify the selectivity of binding of compounds to the parasites with either no or minor effect on cells host, the cytotoxicity assay was determined on peritoneal macrophages murine (Table 3). The Cytotoxic Concentration (CC_{50}) values for the compounds were around 20-30 $\mu\text{g/mL}$. The macrophage's viability was determined with trypan blue test by counting in Neubauer's chamber and the percentage of viability was over than 90.0 %. The percentage of infectiveness to the cells from the control was over than 95.0 %.

Although pentamidine exhibited the lowest IC_{50} value on promastigote and amastigote forms, all the compounds showed less cytotoxicity than this drug.

The SI value greater than 1 exhibited is considered more selective against the parasite than the mammalian cells [22]. All the compounds possess a selective index higher than pentamidine. It was observed that compounds **12**, **9** and **5** were the less cytotoxic compounds on murine macrophages, possessing the highest values. For comparison purposes **5** and **12**, both complexes, were 6.7 and 8.7 fold less toxic than pentamidine.

4. Conclusion

Twelve new palladium complexes of formula $[\text{Pd}_4(\text{LA})_n(\text{X})_4]$ and $[\text{Pd}_4(\text{LB})_n(\text{X})_4]$ were synthesized and characterized. The preliminary results indicate a structure-activity relationship the leishmanicidal activity of the complexes may be modified by the coordination with the metal and the different substituents on the ligand [41, 42]. In general, all palladium complexes showed more potent biological activity *in vitro* than other Pt(II) and Rh(I) complexes evaluated against *L. donovani* promastigotes and amastigotes ($IC_{50}=100 \text{ mg/mL}$) [43] and exhibited less cytotoxicity than pentamidine, a leishmanicidal drug. Furthermore, the most potent complexes were the chloride complex for serie A and the replaced complexes with chloride and SCN for both

series, which were verified to be more active against the parasite and less damaging on mammalian cells. Detailed evaluation about their mechanism of action is necessary. The results obtained in the present study are promising for leishmaniasis disease and are interesting options for further *in vivo* studies.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from CAPES, FINEP, FAPEMIG (CBB-APQ-01465-09, APQ-01059-9, APQ-0446502-07), CNPq (477464/2008-5, 500708/2009-6).

References

- [1] WHO. TDR-Tropical disease research. Progress 2003–2004. **Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases**. Geneva, 2005.< <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>.> acessado em 15 de outubro de 2009.

- [2] DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new Perspectives Comparative Immunology, **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

- [3] SINGH, S., & SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of 381 leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, pp. 307-315, 2004.

- [4] WHO, Geneva <http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html>. Accessed 22 november 2009.
- [5] MORENO, J. HIV-Leishmania infantum co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 328-332, 2000.
- [6] THOMAS, P.A. Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. **Journal of Parasitology**, n.20, p.1361-1367, 2000.
- [7] CRUZ, I. et al. Review. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade, **Indian Journal Medicinal Res** n.123, p. 357-388, 2006.
- [8] MURRAY, H.W., et al. Seminar: Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, n. 366, p. 1561-77, 2005.
- [9] SEIFERT K, MATU S, PEREZ-VICTORIA J, et al. Characterization of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine), **International Journal Antimicrobial Agents**. v. 22, p. 380-387, 2003.
- [10] NATERA, S. et al. Review *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites, **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 29, p. 637-642, 2007.
- [11] TROUILLER P., et al. Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public health policy failure. **Lancet**, n.359, p. 2188-2194, 2002.
- [12] ROSENBERG, Barnett; VAN CAMP, Loratta; KRIGAS, Thomas. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, London, v.205, n. 4972, p.698-699, 1965.
- [13] SAVA, G. et al., Sulphoxide ruthenium complexes: non-toxic tools for the selective treatment of solid tumour metastases, in: M.J. Clarke, P.J. Sadler (Eds.), **Topics in Biological Inorganic Chemistry-Metallopharmaceuticals I**, Springer,

Berlin, 1999, v. 1, p. 143–169.

[14] SHAHEEN, F; et al. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and anti-inflammatory of palladium (II) complexes with tertiary phosphines and heterocyclic thiolates: Crystal structure of $[PdC_{28}H_{19}N_8PS_2]$. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 693, p. 1117-1126, 2008.

[15] GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S.K. ; HADJILIADIS, N. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1384–1397, 2009.

[16] HUSAIN, K.; BHAT, A. R.; AZAM, A. New Pd(II) complexes of the synthesized 1-N-substituted thiosemicarbazones of 3-indole carboxaldehyde: Characterization and antiamebic assessment against *E. histolytica*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.20, p.1-13, 2008.

[17] PANSURIYA, P.B. et al. Synthesis, spectroscopic and biological aspects of iron (II) complexes. **Journal Enz. Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 477-487, aug. 2007.

[18] BOSQUE, F., MILON, G., VALDERRAMA, L., SARAVIA, N.G. Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection of promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Journal of Parasitology**. v. 84, p. 1250–1256, 1998.

[19] PEREIRA, I.O., et al., Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. **Phytomedicine** (2009), doi:10.1016/j.phymed.2009.07.020

[20] TRIPATHI, S., et al. Landrace/gender-based differences in phenol and thiocyanate contents and biological activity in *Piper betle* L. **Current Science**, v. 91, n. 6, p.746–749, sep. 2006.

[21] MOSSMAN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal Immunol. Methods**, v. 65,

p.55-63. 1983.

[22] MARTIN-QUINTAL, Z. et al. In vitro activity of Tridax procumbens against promastigotes of *Leishmania mexicana*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 463-467, Jan. 2009.

[23] Navarro M., et al, Palladium Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Biological Activity on *Leishmania (L.) mexicana*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, Vol. 19, No. 7, 1355-1360, 2008.

[24] FARRELL, N. Transition Metals Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents. **Kluwer Academic Press**, Holanda, 1989.

[25] GOMES-QUIROGA, A.; NAVARRO-RANNINGER, C.N. Review Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Coordination Chemistry Reviews**. n. 248, p. 119–133, 2004.

[26] SÁNCHEZ-DELGADO, R.A.; ANZELLOTTI, A.; SUAREZ, L. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: malaria, trypanosomiasis, and leishmaniasis, in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), **Metal Ions in Biological Systems**, Marcel Dekker, New York, , v. 41 p. 379–419, 2004.

[27] NAVARRO, M. et al. Synthesis and characterization of $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. **Journal of Inorganic Biochemistry**. n.101, p. 111–116, 2007.

[28] PRABHAKARAN, R., et al. Structural and biological studies of mononuclear palladium (II) complexes containing N-substituted thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 268-273, 2008.

[29] FRICKER, S.P., et al. Metal compounds for treatment of parasitic diseases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 1839-1845, 2008.

- [30] TUŠEK-BOŽC, L. et al., 2008. Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium(II) complexes of monoethyl 8-quinolylmethylphosphonate. **Polyhedron**, n. 27, p. 1317–1328, 2008.
- [31] HUSAIN, K.; BHAT, A. R.; AZAM, A. New Pd(II) complexes of the synthesized 1-N-substituted thiosemicarbazones of 3-indole carboxaldehyde: Characterization and antiamebic assessment against *E. histolytica*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.20, p.1-13, 2008.
- [32] RAJAPAKSE, C, S. K. et al., Synthesis, characterization and in vitro Antimalarial and Antitumor activity of Ruthenium (II) complexes of Chloroquine. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p. 1122-1131, 2009.
- [33] TAVARES , J. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug. **Acta Tropica**, n. 103, p. 133–141, 2007.
- [34]VIEITES, M. et al. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5 nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **J. Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 411-418, 2009.
- [35] ALMEIDA, E. T.; et al. Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio(ii) na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 405-408, 2005.
- [36] MORO, A.C. et al. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of $[Pd(C^2, N-dmba)(Br)(tu)]$ (dmba=N,N-dimethylbenzylamine, tu = thiourea). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4611-4615, 2009.
- [37] CROFT S.L. & ENGEL E. Miltefosine — discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 100, p. 4-8, 2006.

[38] SHARIEF, A.H. et al. Leishmania donovani: An in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. **Experimental Parasitology**, v.114, p. 247–252, 2006.

[39] ALI, M.A., et al. Biological activity of palladium (II) and platinum (II) complexes of the acetone Schiff bases of S-methyl-and S-benzylthiothiocarbamate and the X-ray crystal of [Pd(asme)₂] (asme=anionic form of the acetone Schiff base of S-methylthiothiocarbamate) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, p. 141-148, 2002.

[40] AHN, J.H.; LEE, S.; HWANG, S. Growth kinetic parameter estimation of *Klebsiella sp.* utilizing thiocyanate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1363-1366, 2005.

[41] GOMES-QUIROGA, A.; NAVARRO-RANNINGER, C.N. Review Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, n. 248, p. 119–133, 2004.

[42] ROCHA, M.C. et al. Citotoxicity and Immune response induced by organopalladium (II) compounds in Mice bearing Ehrlich Ascites Tumor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1473-1480, 2007.

[43] MESA-VALLE, C.M. et al. Antileishmanial Action of Organometallic Complexes of Pt(II) and Rh(I). **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 5, p. 625-633, Sep./Oct., 1996.